

СИГНАЛЬНЫЕ ФУНКЦИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ ИОНОВ ХЛОРА

© В. А. Семенов,¹ Д. В. Амахин, Н. П. Веселкин

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, 194223;*

¹ электронный адрес: *semenov.vlad.anat@mail.ru*

Цитоплазматические ионы хлора способны влиять на широкий круг внутриклеточных процессов, задействованных в самых разных аспектах жизнедеятельности клетки. В первой части обзора обобщены сведения о разнообразных эффектах, вызываемых внутриклеточными ионами хлора, которые так или иначе способны оказывать влияние на физиологические свойства мембранных рецепторов, экспрессию некоторых генов и протекание ферментативных реакций. Во второй части приведены сведения о происходящих в ходе функционирования нейрона изменениях внутриклеточной концентрации ионов хлора как в норме, так и при патологии. Обобщая полученные на сегодняшний день сведения, можно предположить, что внутриклеточные ионы хлора являются вторичными мессенджерами.

Ключевые слова: внутриклеточные ионы хлора, ГАМК_A-рецепторы, ионный гомеостаз, синаптическое торможение, внутриклеточный сигналинг.

Принятые сокращения: ВПСТ — возбуждающий постсинаптический ток, ГАМК — гамма-аминомасляная кислота, ТПСТ — тормозной постсинаптический ток, 5-НТ — 5-гидрокситриптамин (5-hydroxytryptamine), АЕ3 — анионный обменник 3, CFTR — регулятор трансмембранный проводимости при муковисцидозе, ClC2 — хлоридный канал 2, CSP — хлорид-чувствительные белки, GPCR — G-белоксвязанные рецепторы, HCN-каналы — управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы, IRBIT — протеин, связывающийся с IP3-рецептором и высвобождающийся с ионозитол-1,4,5-трифосфатом (IP3), KCC2 — калий-хлоридный котранспортер 2, mAChR — мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, MAPK — митогенактивируемые протеинкиназы, nAChR — никотиновые ацетилхолиновые рецепторы, NBCe — связанный с натрием обменник бикарбоната, NCBE — зависимый от натрия хлорид-бикарбонатный обменник, NGF — фактор роста нервов, NKCC1 — натрий-калиевый-хлоридный котранспортер 1, NMDA — N-метил-D-аспартат, OSR1-киназа — киназа-1 ответа на оксидативный стресс, SLC26 — транспортер растворенных веществ-26, SPAK — STE20/SPA1-связанная пролин/аланин насыщенная киназа, WNK — лизин-дефицитная протеинкиназа.

Термин «вторичный посредник» (second messenger) применяется для описания молекул или ионов, концентрация которых внутри клетки может изменяться в зависимости от каких-либо внеклеточных сигналов, что в свою очередь прямо или опосредованно вызывает изменения физиологических свойств клетки (Hancock, 2016). Эти изменения могут касаться уровня экспрессии различных генов, активности ферментов, эндоцитоза сигнальных веществ, изменения электрической активности и многих других аспектов жизни клетки. Стогое определения понятия «вторичный мессенджер» не существует, но в то же время принято считать: для того чтобы какая-либо внутриклеточная частица могла выполнять сигнальные функции, необходимо выполнение двух условий. Во-первых, в зависимости от своей концентрации в цитоплазме она должна быть способна запускать какие-либо изменения физиологических свойств клетки. Во-вторых, должны существовать эффективные механизмы регуляции внутриклеточной концентрации этих частиц, запускающиеся в зависимости от каких-либо внешних физиологических стимулов, таких как активация мембранных рецепторов.

В данном обзоре обобщены сведения, демонстрирующие выполнение этих двух условий для внутриклеточных ионов хлора.

Непосредственное влияние внутриклеточных ионов хлора на ионные каналы и транспортеры

Влияние на суперсемейство Cys-loop-рецепторов. Суперсемейство Cys-loop-рецепторов включает в себя никотиновые ацетилхолиновые (nAChR), ГАМК_A, ГАМК_{A-ρ} (ГАМК_C — по предыдущей классификации), глициновые и 5-НТ3-рецепторы. В ряде исследований было выявлено, что ионы хлора играют важную роль в работе ряда представителей этого суперсемейства рецепторов (Frace et al., 1992; Wahl-Schott et al., 2005; Mistrik et al., 2006; Pitt et al., 2008; Houston et al., 2009; Moroni et al., 2011; Sacchi et al., 2011). Так как некоторые представители этого суперсемейства рецепторов, обеспечивающие торможение в ЦНС, проникаемы для ионов

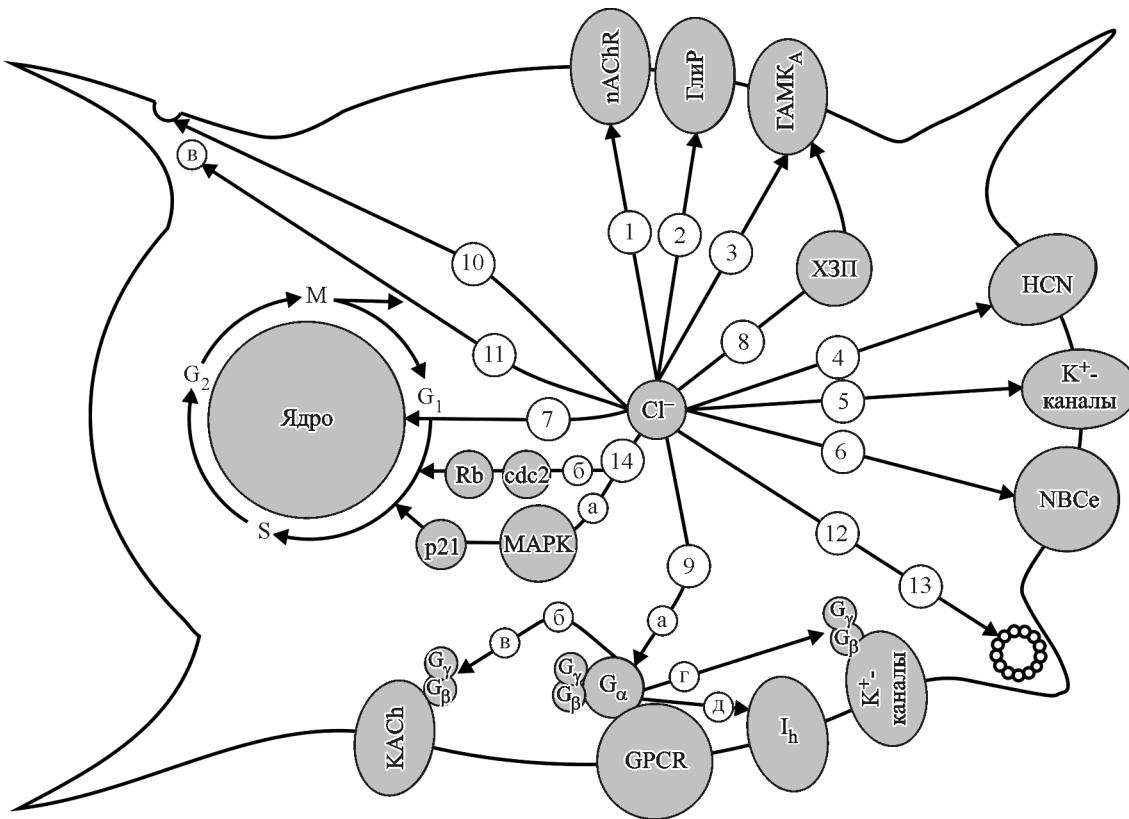


Рис. 1. Влияние изменений внутриклеточной концентрации ионов хлора на различные клеточные компоненты и процессы.

Стрелками указаны различные клеточные компоненты и процессы, на которые влияют изменения $[Cl^-]_i$. 1 — nAChR: $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ спад проводимости Н-холинорецепторов \rightarrow ускорение спада ВПСТ. 2 — ГлиР (глициновые рецепторы): $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ снижение числа взаимодействий с активным центром М2-домена рецептора \rightarrow ускорение инактивации рецептора \rightarrow ускорение спада ТПСТ. 3 — ГАМК_A-рецепторы: $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ снижение количества взаимодействий с активным центром М2-домена рецептора \rightarrow ускорение инактивации рецептора \rightarrow ускорение спада ТПСТ. 4 — HCN-каналы: $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ утрата быстрого компонента I_h -тока. 5 — K^+ -каналы: $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ подавление потенциалзависимых наружных K^+ -токов. 6 — NBCe (NBCe1-B, NBCe2-C): $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ подавление работы котранспортеров. 7 — ядро: а) $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ переключение экспрессии субъединиц ГАМК_A-рецепторов с $\alpha 3$ на $\alpha 1$; б) $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ повышение экспрессии ГАМК_A-рецепторов, содержащих δ -субъединицу; в) $[Cl^-]_i = 27-75$ мМ (EC50 ~46 мМ) \rightarrow подавление экспрессии гена PR27 \rightarrow снижение количества металлопантенатмулина-1; $[Cl^-]_i = 75-125$ мМ (EC50 ~110 мМ) \rightarrow стимуляция экспрессии гена GLRX5 \rightarrow повышение количества металлопантенатмулина-1; г) $\uparrow [Cl^-]_i$ до 50 мМ (EC50 ~34 мМ) \rightarrow стимуляция экспрессии гена GLRX5 \rightarrow повышение количества глутаредоксина-5. 8 — ХЗП: $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ активация ХЗП \rightarrow фосфорилияция ГАМК_A-рецептора \rightarrow спад ГАМК_A-опосредованного тока. 9 — G-белок и GPCR (ГАМК_B-, 5-HT_{1a}-рецепторы и mAChR): а) $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ повышение аффинности G_{α} к ГТФ, ингибирование гидролиза ГТФ α -субъединицей G-белка, снижение скорости диссоциации G_{α} с ГДФ; б) $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ замедление turn-off-реакции G_{β} -белка mAChR \rightarrow повышение чувствительности KACh-каналов к ГТФ \rightarrow способствование открытию канала; в) $\uparrow [Cl^-]_i$ и $\uparrow [GT\Phi]_i$, или $\uparrow [Cl^-]_i$ и $\uparrow [ATF]_i \rightarrow$ turn-on-реакция G_{β} -белка m-холинорецептора или фосфатный трансфер нуклеозидлипосфаткиназы (соответственно) \rightarrow активация KACh; г) $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ воздействие на G-белок, связанный с ГАМК_B- и 5-HT_{1a}-рецепторами \rightarrow подавление ионных токов через K^+ -каналы, опосредованных активацией ГАМК_B- и 5-HT_{1a}-рецепторов; д) $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ воздействие на G-белок \rightarrow подавление гиперполяризационно-активируемых ионных токов (I_h). 10 — эндоцитоз: $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ блокирование быстрого компонента эндоцитоза. 11 — везикулы (в): для работы протонной помпы (H^+ -АТФазы) и окисления везикул необходимо присутствие Cl^- в окружающей цитоплазме; $\uparrow [Cl^-]_i$ в просвете везикулы \rightarrow гипотетическое взаимодействие ионов хлора с чувствительным центром CSP \rightarrow изменение конформации CSP \rightarrow ассоциация с Arf \rightarrow реконструирование цитоплазматических протеиновых комплексов \rightarrow построение мембранны везикулы. 12 — микротрубочки: $\uparrow [Cl^-]_i \rightarrow$ ингибирование ГТФазной активности α -тубулина \rightarrow способствование полимеризации микротрубочек. 13 —нейрит: $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ подавление полимеризации микротрубочек \rightarrow подавление NGF-индукционного роста нейрита. 14 — клеточный цикл и пролиферация: а) $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ активация MAPK \rightarrow ап-регуляция белка p21 \rightarrow замедление перехода из фазы клеточного цикла G₁ в S и из G₂ в M соответственно; б) $\downarrow [Cl^-]_i \rightarrow$ ингибирование фосфорилирования белков Rb и cdc2 \rightarrow подавление перехода клетки из фазы клеточного цикла G₁ в S и из G₂ в M соответственно.

хлора (ГАМК_A-, ГАМК_{A-ρ}- и глициновые рецепторы), можно говорить о регуляции их работы за счет механизма обратной связи. В свою очередь эта обратная связь опосредуется взаимодействием непосредственно самих ионов хлора с определенными центрами связывания, что характерно для «вторичных мессенджеров». Например, такой тип взаимодействия имеет место у Ca^{2+} с NMDA-рецепторами (Kyrozis et al., 1996). Данные по влиянию ионов хлора на различные типы ионных каналов, а также другие проявления их сигнальных функций обобщены на рис. 1.

Влияние ионов хлора на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Известно, что

nAChR не пропускают ионы хлора (Albuquerque et al., 2009). В то же время при исследовании изменений катионной селективности nAChR в ганглиозных синапсах крысы (Sacchi et al., 2011) было выявлено, что снижение как внутриклеточной, так и наружной концентрации ионов хлора приводит к спаду проводимости nAChR и ускорению спада возбуждающего постсинаптического тока (ВПСТ), что говорит о воздействии ионов хлора на nAChR как снаружи, так и изнутри клетки. Механизм, за счет которого ионы хлора влияют на работу nAChR, остается неизвестным (Sacchi et al., 2011).

Влияние на ГАМК_A- и глициновые рецепторы. ГАМК_A- и глициновые рецепторы опосредуют

процесс торможения в ЦНС. Кинетика тормозных постсинаптических токов (ТПСТ) является крайне важным физиологическим свойством, определяющим временное течение процесса торможения в нервной системе. Исследование динамики ГАМК_A-опосредованного вызванного ТПСТ в нейронах Пуркинье мозжечка крысы методом пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» показало, что при низких значениях внутриклеточной концентрации ионов хлора (5—10 мМ) ТПСТ имеет более быструю фазу спада, чем при высоких значениях. Увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора пропорционально увеличивало длительность ТПСТ и его фазы спада, что было заметно даже при изменении внутриклеточной концентрации ионов хлора в физиологических пределах — от 5 до 30 мМ. Минимальная скорость спада ТПСТ наблюдалась при внутриклеточной концентрации ионов хлора 150 мМ. Аналогичные результаты в этом же исследовании были получены и при анализе спонтанных миниатюрных ТПСТ в нейронах Пуркинье мозжечка крысы, а также в культуре клеток, экспрессирующих ГАМК_A-рецепторы. В последнем случае результаты были получены с использованием специальной установки, позволяющей совершать короткие и быстрые подачи агониста на фрагмент мембранны (конфигурация outside-out метода пэтч-кламп). Полученные некоторыми авторами данные позволяют заключить, что зависимость кинетики ГАМК-опосредованных токов от концентрации внутриклеточных ионов хлора способна оказать существенное влияние на эффективность торможения в ЦНС (Houston et al., 2009).

Похожие результаты были получены в исследовании влияния внутриклеточных ионов хлора на кинетику глицинергических токов, вызванных быстрой аппликацией глицина на фрагменты мембранны (метод пэтч-кламп в конфигурации outside-out) мотонейронов спинного мозга крысы. Было выявлено, что высокие внутриклеточные концентрации ионов хлора являются причиной замедления скорости спада этого тока. Время инактивации глициновых рецепторов увеличивалось в 3 раза при изменении внутриклеточной концентрации ионов хлора с 10 до 131 мМ. Увеличение времени инактивации наблюдали уже при повышении внутриклеточной концентрации ионов хлора до 30 мМ. Также было показано, что ионы хлора действовали только на воротный механизм канала рецептора, тогда как на связывание агониста они не оказывали влияния (Pitt et al., 2008).

Дальнейшее исследование, проведенное на глициновых и ГАМК_A-рецепторах клеток линии HEK293, позволило пролить свет на механизм влияния внутриклеточных ионов хлора на эти ионные каналы (Moroni et al., 2011). Авторами описано замедление кинетики ответов при увеличении внутриклеточной концентрации ионов хлора, хорошо согласующееся с результатами предыдущего исследования (Pitt et al., 2008). Также для обоих типов рецепторов было отмечено, что снижение внеклеточной концентрации ионов хлора увеличивает скорость инактивации рецепторов, но этот эффект проявляется себя только при крайне низкой внутриклеточной концентрации ионов хлора, например 4 мМ (Moroni et al., 2011). Предполагается непосредственный эффект ионов хлора на глициновые и ГАМК_A-рецепторы без участия каких-либо внутриклеточных сигнальных каскадов. Считается, что у глициновых и ГАМК_A-рецепторов имеются широкий внеклеточный и узкий внутриклеточный вестибулюи (vestibules) (Paas et al., 2005; Unwin, 2005; Bocquet

et al., 2009; Hilf, Dutzler, 2009; Pittel et al., 2010; Hibbs, Gouaux, 2011). Оба вестибулюи содержат положительно заряженные аминокислотные остатки, которые концентрируют проникающие ионы (O'Mara et al., 2005; Ivanov et al., 2007; Song, Corry, 2010). Вестибулюи сужаются по направлению друг к другу, и на их границе, в самой узкой части канала, расположен гипотетический «активный центр» для ионов хлора взаимодействие с которым приводит к изменению свойств ионного канала. Когда канал открыт, ионы хлора проходят сквозь это узкое место и взаимодействуют с данным «активным центром» внутри поры. Это в свою очередь либо стабилизирует открытое состояние канала, либо препятствует его закрытию (так называемый foot-in-the-door-эффект). Активация рецептора при отрицательных значениях мембранныго потенциала и высокой внутриклеточной концентрации ионов хлора приводит к их выходу из клетки, при этом гипотетический «активный центр» оказывается связанным с ионами хлора более продолжительное время, поскольку последние сконцентрированы в узком внутреннем вестибулюе канала и быстро занимают освободившийся «активный центр». Но если внутриклеточная концентрация ионов хлора снизится, то и концентрация внутри узкого вестибулюя тоже станет ниже, что приведет к менее оперативному заполнению активного центра и, следовательно, более быстрому закрытию канала.

При условиях, когда ионы хлора входят в клетку, скорость их потока ограничивается за счет узкого внутреннего вестибулюя, что приводит к увеличению времени взаимодействия ионов хлора с «активным центром». Время инактивации в этом случае не зависит от обновления «активного центра» ионами хлора снаружи. Даже если концентрацию ионов хлора внутри клетки уменьшить со 130 до 15 мМ, это не будет влиять на инактивацию. Уменьшение внеклеточной концентрации ионов хлора оказывает влияние на инактивацию, только если уменьшить внутриклеточную концентрацию ионов хлора до 4 мМ, при данной концентрации прохождение ионов хлора через канал ускоряется. В этом случае снижение внеклеточной концентрации ионов хлора уменьшает скорость деактивации рецептора (Moroni et al., 2011).

При помощи генной инженерии удалось выявить несколько структурных компонентов, опосредующих влияние ионов хлора на глициновые и ГАМК_A-рецепторы. Предполагается, что M2-домен $\alpha 1$ -субъединицы, образующий выстилку просвета канала, имеет «активный центр» для ионов хлора. Мутации в аминокислотных остатках R19'A или A-1'E этого домена, делающие рецептор проницаемым для катионов, а также утрата положительного заряда в аминокислотных остатках 19' и 29' α -субъединицы лишали воротный механизм канала рецептора чувствительности к ионам хлора. Это указывает на важность этих аминокислотных остатков для эффекта ионов хлора, хотя их точная роль остается неизвестной (Moroni et al., 2011).

Также стоит отметить, что ионы хлора оказывают влияние на зависимость инактивации cys-loop-рецепторов от мембранныго потенциала (при его высоких значениях спад тока пролонгируется) (Magleby, Stevens, 1972; Legendre, 1999). Эта зависимость исчезала при замещении ионов хлора на другой проникающий ион, например тиоционат, а также при мутациях в аминокислотных остатках R19'A и A-1'E (Moroni et al., 2011).

Влияние ионов хлора на HCN-каналы. HCN-каналы (hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-

de-gated channels, управляемые циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемые каналы) активируются при гиперполяризации мембранны и пропускают исключительно катионы (Biel et al., 2009). Имеются данные о том, что на гиперполяризационно-активируемый ток (I_h -ток) оказывают влияние ионы хлора, причем как внутриклеточные, так и внеклеточные (Frace et al., 1992; Wahl-Schott et al., 2005). Например, в клетках синусового узла сердца кролика амплитуда I_h -тока HCN-каналов снижалась, когда внеклеточные ионы хлора были замещены ионами аспартата (Frace et al., 1992). Молекулярные механизмы регуляции HCN-каналов внеклеточными ионами хлора были исследованы на экспрессированных HCN-каналах в культуре клеток HEK293 (Wahl-Schott et al., 2005). Продемонстрировано, что ионы хлора преимущественно влияют на HCN2- и HCN4-каналы, тогда как на HCN1-каналы их влияние было незначительным (Wahl-Schott et al., 2005). Аргининовые остатки в позициях R405 для HCN2 и R483 для HCN4 обусловливают высокую чувствительность этих каналов к ионам хлора (Wahl-Schott et al., 2005).

Кроме того, ионы хлора влияют на HCN-каналы через внутриклеточные центры. Так, по данным некоторых авторов, при высоких внутриклеточных концентрациях ионов хлора (140 мМ) полностью пропадает мгновенный компонент I_h -тока HCN-каналов (Mistrik et al., 2006).

Влияние ионов хлора на калиевые каналы. В исследовании на астроцитах гиппокампа крысы с использованием метода пэтч-кламп в конфигурации «целая клетка» было продемонстрировано поведение ионов хлора как вторичных мессенджеров по отношению к калиевой проводимости (конкретный вид калиевых рецепторов не был определен). Блокада калиевых токов в данном исследовании происходила при активации ГАМК_A-рецепторов мусцимолом (Bekar, Walz, 1999). Как известно, в астроцитах E_{Cl} более позитивный, чем мембранный потенциал, и при активации ГАМК_A-рецепторов происходит ток ионов хлора из клетки и деполяризация мембранны (Fraser et al., 1995). В исследовании были подобраны условия (симметричная концентрация ионов хлора в 130 мМ ($E_{Cl} = 0$ мВ), удерживаемый потенциал -80 мВ), при которых активация ГАМК_A-рецепторов также приводила бы к току ионов хлора из клетки. Как выяснилось, понижение внутриклеточной концентрации ионов хлора подавляло потенциалзависимые наружные калиевые токи приблизительно на 35 %, влияя как на фазу пика тока, так и на фазу плато. Данная блокада была независимой от прямого действия мусцимола, так как при его аппликации на ГАМК_A-рецепторы без тока ионов хлора, например при их замещении на ионы глюконата или совместной аппликации с пикротоксином, блокады не происходило. Это подтверждает необходимость снижения внутриклеточной концентрации ионов хлора для ее осуществления. Данная хлоридопосредованная модуляция наружной калиевой проводимости может иметь важное значение в прогрессировании распространяющейся корковой депрессии и набухания астроцитов при патологических состояниях (Bekar, Walz, 1999).

Влияние на $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ -котранспортеры. Ионы хлора могут регулировать внутриклеточные концентрации ионов Na^+ и HCO_3^- , а также трансэпителиальный транспорт за счет модуляции активности нескольких видов $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ -котранспортеров. В исследовании влияния ионов хлора на NBCe1-A, NBCe1-B и NBCe2-C было выявлено, что работа этих котранспортеров (за ис-

лючением NBCe1-A) подавлялась при высокой внутриклеточной концентрации ионов хлора. В основе молекулярных механизмов данной модуляции лежала способность ионов хлора действовать на определенные центры связывания, находящиеся в этих котранспортерах и содержащие специфическую аминокислотную последовательность (мотив) GXXXXP, опосредующую хлоридную чувствительность (Shcheynikov et al., 2015).

NBCe1-B (повсеместно распространенный транспортер) имеет два центра связывания с мотивом GXXXXP, один из которых низкоаффинный к ионам хлора, а другой высокоаффинный. В основном высокоаффинный центр связывания NBCe1-B не соприкасается с клеточным содержимым из-за действия белка IRBIT, поэтому с ионами хлора взаимодействует низкоаффинный центр (Shcheynikov et al., 2015). NBCe1-A резистентен к изменению внутриклеточной концентрации ионов хлора в пределах от 5 до 140 мМ за счет того, что центр связывания ионов хлора, содержащий мотив GXXXXP, «спрятан» внутри котранспортера (криптический центр) и не соприкасается с внутриклеточным содержимым. Удаление определенных аминокислотных остатков NBCe1-A при помощи методов генной инженерии помогло определить, что центр связывания для ионов хлора у NBCe1-A гомологичен низкоаффинному центру у NBCe1-B (Shcheynikov et al., 2015). NBCe2-C регулируется ионами хлора за счет единичного высокоаффинного центра связывания, содержащего мотив GXXXXP, поэтому NBCe2-C наиболее чувствителен к изменению внутриклеточной концентрации ионов хлора (Shcheynikov et al., 2015).

Анализ аминокислотных последовательностей некоторых других котранспортеров, включая транспортеры ионов хлора CFTR, NKCC1, NKCC2, KCC, NCC, и большого количества транспортеров из семейства SLC26 показал, что все они содержат по крайней мере один мотив GXXXXP, расположенный во внутриклеточном домене, и это потенциально может опосредовать их модуляцию ионами хлора (Shcheynikov et al., 2015).

Влияние ионов хлора на внутриклеточные физиологические процессы

Влияние на экспрессию генов. На нейронах мозжечка мыши с использованием флуоресцентной микроскопии было показано, что снижение внутриклеточной концентрации ионов хлора переключает экспрессию субъединиц ГАМК_A-рецепторов с $\alpha 3$ на $\alpha 1$, а также повышает экспрессию ГАМК_A-рецепторов, содержащих δ -субъединицу. Первое приводит к ускорению кинетики ТПСТ, опосредованных синаптическими ГАМК_A-рецепторами, второе увеличивает количество экстрасинаптических ГАМК_A-рецепторов и, следовательно, опосредованного ими тонического ГАМК_A-ergicеского тока (Succol et al., 2012). Точные механизмы влияния ионов хлора на субъединичный состав ГАМК_A-рецепторов неизвестны.

На бронхоэпителиальных клетках (IB3-1) пациентов, страдающих кистозным фиброзом, было показано, что экспрессия гена PR27, кодирующего мультифункциональный рибосомный протеин RPS27, также известный как металлонантимулин-1, участвующий в reparации ДНК (Fernandez-Pol et al., 1994), канцерогенезе (Fernandez-Pol et al., 1997; Ganger et al., 1997; Stack et al., 2004; Fernandez-Pol, 2011) и входящий в структуру рибосомы

(Tsui et al., 1996), подавлялась при внутриклеточной концентрации ионов хлора, находящейся в пределах 25—75 мМ (EC₅₀ ~46 мМ), и увеличивалась при внутриклеточной концентрации ионов хлора, находящейся в пределах 75—125 мМ (EC₅₀ ~110 мМ) (Valdivieso et al., 2016). Экспрессия гена *GLRX5*, кодирующего митохондриальный протеин глутаредоксин-5, поддерживающий гомеостаз железа в митохондриях и клетке (Rodriguez-Manzaneque et al., 2002; Wingert et al., 2005), возрастала при увеличении внутриклеточной концентрации ионов хлора. Эта зависимость имела вид сигмоидальной кривой дозы—эффект с плато при внутриклеточной концентрации ионов хлора в 50 мМ (EC₅₀ ~34 мМ). Эти данные подтверждают существование хлоридзависимых генов, а также демонстрируют, что ионы хлора действуют на них как вторичный мессенджер (Valdivieso et al., 2016). Точные механизмы обнаруженной модуляции остаются неизвестными.

Регуляция активности внутриклеточных ферментов. В исследовании фосфорилирования ГАМК_A-рецепторов нейронов коры головного мозга крысы было обнаружено существование хлоридзависимой протеинкиназы, которая может быть в значительной степени гомологична протеинкиназе А. Считается, что она участвует в отрицательной обратной связи при активации ГАМК_A-рецепторов со следующим механизмом действия: активация ГАМК_A-рецепторов при физиологических условиях приводит к току ионов хлора внутрь клетки; повышение внутриклеточной концентрации ионов хлора активирует хлорзависимую протеинкиназу; активированная хлорзависимая протеинкиназа фосфорилирует ГАМК_A-рецепторы, что в итоге ослабляет ГАМК_A-опосредованный ток (Lanius et al., 1993).

Влияние на G-белки. G-белки — семейство белков, вовлеченных в передачу различных внеклеточных сигналов внутрь клетки. G-белки активируются G-белоксвязанными рецепторами (GPCR) и состоят из G_a-, G_b- и G_y-субъединиц. Существуют различные классы G_a-субъединиц (например, G_iα, G_oα, G_sα и др.). При активации G-белка субъединица G_a и димер G_b диссоциируются друг от друга и запускают каскад внутриклеточных реакций (Simon et al., 1991).

В первом исследовании влияния ионов хлора на G-белки был продемонстрирован прямой эффект ионов хлора на G_a-субъединицу очищенного G_o-протеина (G_oα-субъединица). При увеличении внутриклеточной концентрации ионов хлора возрастила аффинность G_oα к ГТФ, ингибиравался гидролиз ГТФ α-субъединицей G-белка, а также снижалась скорость диссоциации G_oα с ГДФ. Стоит отметить, что последний эффект проявлялся только в присутствии Mg²⁺ (Higashijima et al., 1987).

В дальнейшем в исследовании, выполненном на клеточных мембранных миоцитов атриума сердца морской свинки, было показано, что ионы хлора влияют на G_K-белок, чувствительный к коклюшному токсину (Nakajima et al., 1992). Данный G_K-белок является ингибирующим G-белком, содержащим α-субъединицу, связывающую мускариновые ацетилхолиновые рецепторы (mAChR) с K⁺-каналами внутреннего выпрямления (KACh-каналы) (Breitwieser, Szabo, 1985; Pfaffinger et al., 1985; Kurachi et al., 1986a, 1986b; Codina et al., 1987). Внутриклеточные ионы хлора повышают чувствительность KACh-каналов к ГТФ, что способствует их открытию. В присутствии ионов хлора во внутриклеточном растворе активация KACh-каналов требует меньшей концентрации ГТФ, чем

в растворах, не содержащих ионов хлора. Как показало исследование, этот эффект обуславливается тем, что ионы хлора замедляют turn-off-реакцию G_K-белка (Nakajima et al., 1992).

Известно, что увеличение внутриклеточной концентрации ГТФ и АТФ может активировать KACh-каналы даже в отсутствие агониста: ГТФ самостоятельно (базальная активация) (Ito et al., 1991; Okabe et al., 1991), АТФ за счет фосфатного трансфера, осуществляемого нуклеозиддифосфаткиназой (Heidbüchel et al., 1990; Kaibara et al., 1991; Heidbüchel et al., 1992). Как показало исследование, это происходит только при высокой внутриклеточной концентрации ионов хлора (130 мМ). При замещении ионов хлора на другие ионы (65 мМ SO₄²⁻ или 130 мМ I⁻) активации не происходило вообще или она была незначительной. Предполагается, что в данном случае ионы хлора воздействуют на базальную turn-on-реакцию G_K-белка и фосфатный трансфер нуклеозиддифосфаткиназы (Nakajima et al., 1992).

Наиболее позднее исследование влияния ионов хлора на G-белок было проведено на CA1-нейронах гиппокампа крысы. В исследовании было продемонстрировано, что при высокой внутриклеточной концентрации ионов хлора за счет воздействия последних на G-белок снижается G-белокопосредованная ионная проводимость (Lenz et al., 1997), представленная гиперполяризационно-активируемыми ионными токами (неселективные катионные токи в CA1) (Halliwell, Adams, 1982; Maccaferri et al., 1993) и ионными токами, опосредованными активацией ГАМК_B- и 5-HT_{1a}-рецепторов (реализуются за счет активации K⁺-каналов G-белком; Andrade et al., 1986).

Влияние на эндоцитоз и биогенез синаптических везикул. Прежде всего стоит отметить, что эндоцитоз играет важную роль в биогенезе синаптических везикул. После слияния везикулы с мембраной в результате процесса эндоцитоза эндоцитоз быстро возвращает везикулярную мемброну в цитозоль, где она может быть вновь использована для формирования новых везикул (Zhang et al., 1999). Эндоцитоз особенно важен для поддержания химической нейротрансмиссии в течение длительной синаптической активности (Brodin et al., 1997).

Для изучения эндоцитоза используется метод пэтч-кламп, при котором параметры этого процесса определяются по изменению емкости мембранны (ΔC_m). При эндоцитозе емкость мембранны скачкообразно изменяется, так как изменяется площадь мембранны, причем кинетика ΔC_m отражает кинетику эндоцитоза. Благодаря использованию этого метода на биполярных клетках сетчатки золотых рыбок было выявлено, что эндоцитоз характеризуется многокомпонентной кинетикой, включающей в себя медленный и быстрый компоненты (von Gersdorff, Matthews, 1994; Neves et al., 2001).

В более позднем исследовании, также выполненному методом patch-clamp на биполярных клетках сетчатки золотых рыбок, было установлено, что локальное повышение концентрации ионов хлора в клеточных терминалях селективно блокирует быстрый компонент эндоцитоза (Hull, von Gersdorff, 2004). Концентрация ионов хлора увеличивается в терминалях нейронов в результате активации ГАМК_A- и ГАМК_C-рецепторов (Tachibana, Kaneko, 1987; Matthews et al., 1994), что приводит к блокированию быстрого компонента и, следовательно, скорости эндоцитоза нейротрансмиттера. Быстрый компонент эндоцитоза восстанавливается в случаях, когда увеличение

пресинаптической концентрации ионов хлора блокируется, что происходит после разрушения синаптических контактов клеток путем их острой диссоциации, аппликации антагонистов ГАМК_A- и ГАМК_C-рецепторов, использования внеклеточных растворов, не содержащих ионов хлора. Так, скорость эндоцитоза была в 5–10 раз меньше у диссоциированных клеток, чем у клеток в ретинальных срезах (Hull, von Gersdorff, 2004).

В исследовании на изолированных везикулах хромо-аффинных клеток надпочечников было замечено, что для работы протонной помпы (H^+ -АТФазы) везикул необходимо присутствие ионов хлора в окружающей цитоплазме. Предполагается наличие центров связывания для ионов хлора у H^+ -АТФазы на внешней стороне везикулы (Moriyama, Nelson, 1987). В подтверждение этому было обнаружено, что при замещении ионов хлора в среде с внешней (цитоплазматической) стороны везикул на NO_3^- способность везикул к окислению содержимого пропадала (Zeuzem et al., 1992).

Кроме того, предполагается, что в биогенезе везикул участвуют трансмембранные хлорид-чувствительные белки (CSP — chloride-sensitive proteins). При увеличении концентрации ионов хлора в просвете везикулы происходит взаимодействие ионов хлора с чувствительным центром CSP. В результате CSP меняет свою конформацию и его циотозольный конец может воздействовать на сигнальные молекулы. В частности, CSP может ассоциироваться с малым фактором АДФ-рибозилирования (Arf) (Faundez, Hartzell, 2004), который является основным внутриклеточным регулятором биогенеза везикул (Pasqualato et al., 2002). После ассоциации CSP и Arf последний рекрутирует цитоплазматические протеиновые комплексы, необходимые для построения мембранные везикулы. Однако поскольку CSP еще не идентифицирована, связь между концентрацией ионов хлора в просвете везикулы и биогенезом везикулы остается лишь теоретической (Faundez, Hartzell, 2004).

Регуляция полимеризации микротрубочек и роста нейрита. Формирование и рост нейрита является крайне важным процессом в развитии нервной клетки. Нейрит образуется на ранних стадиях дифференцирования нейрона и представляет собой выступ на теле клетки, достигающий в длину от 10 мкм до 1 мм (в некоторых случаях и больше). В дальнейшем из нейрита формируется или аксон, или дендрит (Dotti et al., 1988; Craig, Banker, 1994; Namba et al., 2015). Рост нейрита в основном происходит за счет формирования длинных ассоциаций микротрубочек (полимеризации микротрубочек) (Keith, 1990; Conde, Cáceres, 2009). Для включения димера тубулина в состав микротрубочки субъединицы димера должны быть обязательно связаны с ГТФ. Со временем происходит гидролиз ГТФ до ГДФ под действием внутренней ГТФазной активности субъединиц димера, что в конечном счете приводит к распаду микротрубочек (Stephens, Edds, 1976; Caplow, 1992; Hamm-Alvarez, Sheetz, 1998; de Forges et al., 2012).

В исследовании *in vitro* было обнаружено, что при повышении внутриклеточной концентрации ионов хлора происходит ингибирование ГТФазной активности α -тубулина, что способствует полимеризации микротрубочек *in vitro* (Nakajima et al., 2012). Этим могут объясняться результаты исследований модуляции роста нейрита внутриклеточными ионами хлора *in vivo*. Так, например, в более ранних исследованиях было показано, что нокаутирование NKCC1, приводящее к снижению внутриклеточной

концентрации ионов хлора в верхушке нейрита, блокирует NGF-индуцированный рост нейрита (NGF — nerve growth factor, фактор роста нервов) (Nakajima et al., 2007, 2011a, 2011b). Напротив, стимулирование NKCC1 флавоноидами кверцетином и генистеином (Nakajima et al., 2011a, 2011b), а также ингибиование KCC1 (Nakajima et al., 2012), приводящие к повышению внутриклеточной концентрации ионов хлора, стимулируют NGF-индуцированный рост нейрита.

В недавнем исследовании на клетках PC-12 было показано, что внутриклеточная концентрация ионов хлора в месте роста нейрита выше, чем в теле клетки, более того, имеется положительная корреляция между длиной растущего нейрита и внутриклеточной концентрацией ионов хлора в его верхушке. Также в этом исследовании было продемонстрировано, что ингибитор NKCC1 бутамид, уменьшая внутриклеточную концентрацию ионов хлора в нервной клетке, в значительной степени подавлял рост нейрита (Nakajima, Marunaka, 2016).

Все эти исследования, проведенные *in vitro* и *in vivo*, указывают на то, что высокая внутриклеточная концентрация ионов хлора в верхушке нейрита является необходимым фактором для нормального роста нейрита, как предполагается, за счет влияния ионов хлора на полимеризацию микротрубочек (Nakajima, Marunaka, 2016).

Принимая во внимание влияние ионов хлора на полимеризацию микротрубочек, которые являются одной из главных составляющих цитоскелета у эукариот (от дрожжей до человека) и выполняют крайне необходимые функции, не только связанные с поддержанием роста нейрита, но также и с сегрегацией хроматина в процессе митоза, формированием органелл, метаболизмом везикул и поляризацией полярных клеток (например, эпителиальных клеток) (Stephens, Edds, 1976; Caplow, 1992), можно предположить, что внутриклеточные ионы хлора вовлечены в регуляцию всех вышеперечисленных внутриклеточных процессов.

Влияние ионов хлора на клеточный цикл и пролиферацию. Внутриклеточные ионы хлора могут играть важную роль в механизмах регуляции роста и пролиферации клеток. Так, было продемонстрировано, что снижение внутриклеточной концентрации ионов хлора подавляет клеточную пролиферацию в клетках MKN28 рака желудка за счет замедления перехода G₁-фазы клеточного цикла в S-фазу. Как предполагают авторы исследования, это происходит за счет ап-регуляции белка p21, ингибирующего клеточный рост (Miyazaki et al., 2008). В более позднем исследовании на клетках MKN28 рака желудка было выявлено, что низкая внутриклеточная концентрация ионов хлора активирует определенные митогенактивируемые протеинкиназы (MAPK — mitogen-activated protein kinase), повышающие экспрессию p21 (Ohsawa et al., 2010). На данный момент точные молекулярные механизмы влияния ионов хлора на экспрессию p21 остаются неизвестными.

В исследовании на PC3-клетках андрогенонезависимого рака простаты было обнаружено, что PC3-клетки, которые культивировались в течение 96 ч в среде с высокой концентрацией ионов хлора (113 мМ), делились в 9 раз быстрее, чем клетки, культивированные в среде с низкой концентрацией ионов хлора (8 мМ). Кроме того, использование блокаторов NKCC — фуросемида и бутамиды — также подавляло рост PC3-клеток. Как предполагается, среда с низкой концентрацией ионов хлора снижает концентрацию ионов хлора внутри клетки, что в

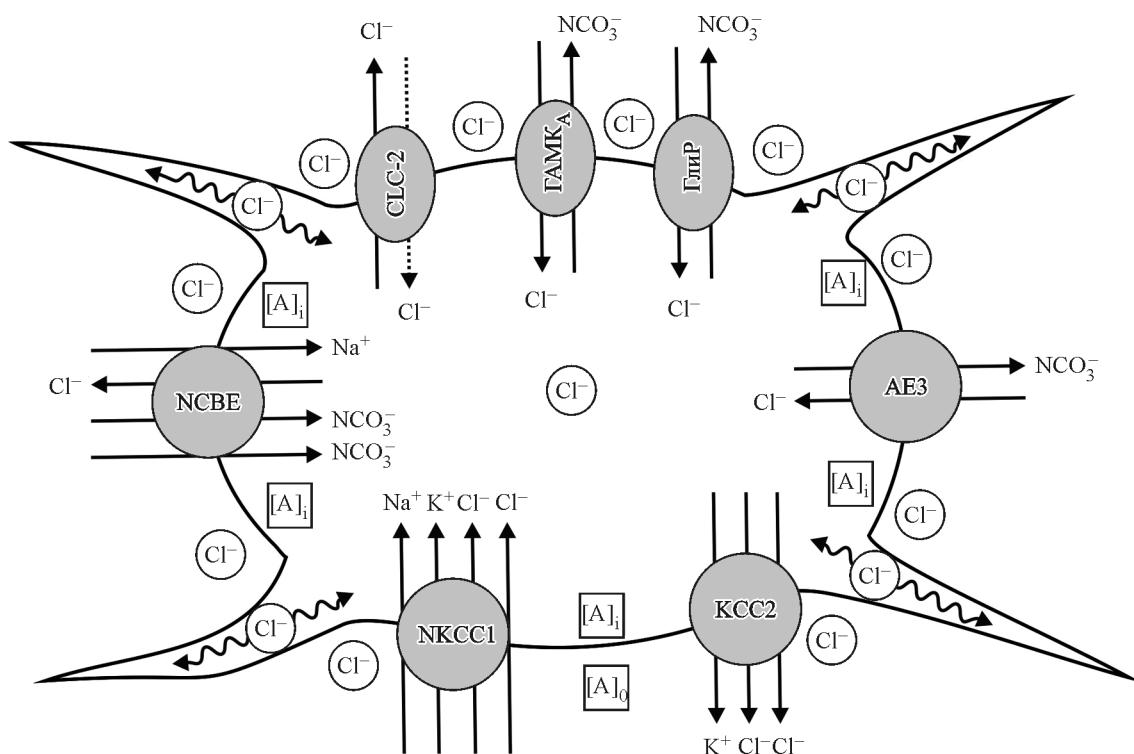


Рис. 2. Основные участники регуляции концентрации ионов хлора внутри нервной клетки.

Схематически изображены плазматическая мембрана нервной клетки, в которую включены основные переносчики ионов хлора (стрелками указано направление движения ионов): ClC-2-канал (проницаем только для Cl^- , согласно классическим представлениям, активируется при гиперполяризации мембранны и пропускает Cl^- только изнутри клетки наружу, согласно альтернативной точке зрения, пропускает ионы хлора в обе стороны); ГАМК Δ -и глициновый рецепторы (при активации агонистами в норме в зрелой нервной клетке пропускают Cl^- внутрь клетки, а HCO_3^- наружу); AE3 (обменник, стехиометрия 1 : 1; $\text{Cl}^- : \text{HCO}_3^-$); KCC2 (котранспортер, использует K^+ -градиент для выхода Cl^- из клетки, стехиометрия 1 : 1, $\text{K}^- : \text{Cl}^-$, целевая величина $[\text{Cl}^-]_i \sim 3 \text{ mM}$); NKCC1 (котранспортер, использует Na^+ -градиент для закачки Cl^- внутрь клетки, стехиометрия 1 : 1 : 2; $\text{Na}^- : \text{K}^- : \text{Cl}^-$, целевая величина $[\text{Cl}^-]_i \sim 60 \text{ mM}$); NCBE (обменник, стехиометрия 1 : 1 : 2; $\text{Na}^- : \text{Cl}^- : \text{HCO}_3^-$, волнистая линия со стрелками на концах и схематическим изображением Cl^- по середине указывает на наличие диффузии Cl^- в отростках нервной клетки, $[\text{A}]_i$, $[\text{A}]_o$ — полianiонные внеклеточные гликопротеины внутри и вне клетки соответственно (в норме $[\text{A}]_i > [\text{A}]_o$, что способствует уменьшению $[\text{Cl}^-]_i$ за счет эффекта Гиббса—Доннана). В норме в зрелой нервной клетке поддерживается низкой $[\text{Cl}^-]_i$.

свою очередь запускает ряд внутриклеточных процессов: ингибирование фосфорилирования белков Rb и cdc2 (Hiraoka et al., 2010) — ключевых акселераторов перехода клетки из фазы клеточного цикла G_1 в фазу S и из G_2 в фазу M соответственно (Alberts et al., 2008); ап-регуляцию протеина p21 (Hiraoka et al., 2010), ингибирующего переход клетки из фазы G_1 в фазу S (Alberts et al., 2008); блокаду включения 5-этинил-2'-дезоксиуридуина в ДНК, указывающую на удлинение фазы S (Hiraoka et al., 2010).

Таким образом, низкая внутриклеточная концентрация ионов хлора влияет на многие процессы клеточного цикла, удлиняя течение всех его фаз, тем самым замедляя процессы роста PC3-клеток (Hiraoka et al., 2010).

Регуляция концентрации ионов хлора внутри нервной клетки

Механизмы регуляции внутриклеточной концентрации ионов хлора. Регуляция концентрации ионов хлора внутри клетки включает в себя множество процессов, которые как повышают, так и снижают ее. Наиболее значимые механизмы регуляции внутриклеточных ионов хлора, обобщены на рис. 2. Информация, касающаяся строения ионных каналов и обменников, участвующих в регуляции ионов хлора, подробно изложена в обзорах (Jentsch et al., 2002; Gamba, 2005; Kaila et al.,

2014). В результате сложного взаимодействия механизмов регуляции внутриклеточная концентрация ионов хлора поддерживается в состоянии динамического равновесия, при этом концентрация ионов хлора в большинстве зрелых нервных клеток ЦНС многократно ниже их внеклеточной концентрации (Ben-Ari, 2002; Kaila et al., 2014). Ведущую роль в гомеостазе ионов хлора играют катион-хлоридные котранспортеры NKCC1 и KCC2 (Rivera et al., 1999; Blaesse et al., 2009). Их работа электронейтральна и не сопряжена напрямую с энергетическим потреблением, но так как они используют Na^+ - и K^+ -электрохимический градиент, их функционирование энерго-зависимо от $\text{Na}^+ \text{-} \text{K}^+$ -АТФазы. KCC2 является основным котранспортером ионов хлора, который присутствует только в нервных клетках ЦНС. KCC2 осуществляет выход ионов хлора из клетки за счет K^+ -градиента (имеет стехиометрию 1 : 1, $\text{K}^- : \text{Cl}^-$). Для KCC2 целевая величина концентрации ионов хлора внутри клетки составляет $\sim 3 \text{ mM}$ (Payne, 1997; DeFazio et al., 2000). NKCC1 определяет ток ионов хлора внутрь клетки за счет Na^+ -градиента (Bramblett, Staley, 2008). NKCC1 имеет стехиометрию 1 : 1 : 2, $\text{Na}^- : \text{K}^- : \text{Cl}^-$. Для NKCC1 целевая величина концентрации ионов хлора внутри клетки составляет $\sim 60 \text{ mM}$ (Alvarez-Leefmans, Delpire, 2009).

Результаты проведенных исследований NKCC1 и KCC2 указывают на их реципрокную регуляцию, чувствительную к изменениям внутриклеточной концентрации

ионов хлора (Lytle, Forbush, 1996; Russell, 2000). Снижение последней ниже физиологического значения ведет к фосфорилированию NKCC1 в специфичных аминокислотных остатках N-концевого домена, приводящему к активации NKCC1 и восстановлению физиологического значения внутриклеточной концентрации ионов хлора (Haas et al., 1995; Lytle, Forbush, 1996). Напротив, увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора стимулирует активность KCC2 (Williams, Payne, 2004).

Существует гипотеза, согласно которой Cl-чувствительные серинтреониновые киназы семейства WNK, действующие через STE20-киназы SPAK (STE20/SPS1-related proline/alanine-rich kinase) и OSR1 (oxidative stress-responsive kinase 1), могут быть частью системы реципрокной регуляции, чувствительной к изменению внутриклеточной концентрации ионов хлора (Piala et al., 2014). Указанные киназы изменяют степень фосфорилирования KCC2 и NKCC1 и, следовательно, их активность, поддерживая их функционирование в пределах физиологической нормы (Delpire, Gagnon, 2008; Alessi et al., 2014; delos Heros et al., 2014). Активация указанных киназ происходит при низкой внутриклеточной концентрации ионов хлора, что приводит к фосфорилированию цитозольных аминокислотных остатков N-концевого домена NKCC1 и последующему поступлению ионов хлора внутрь клетки (Alessi et al., 2014). Кроме того, киназа WNK-3 при низкой внутриклеточной концентрации ионов хлора фосфорилирует треониновый остаток N-концевого домена напрямую (Alessi et al., 2014). В противоположность этому фосфорилирование C-концевого домена за счет SPAK и OSR1 снижает KCC2-опосредованный транспорт ионов хлора и калия из клетки (Rinehart et al., 2009; Inoue et al., 2012; delos Heros et al., 2014). Помимо указанной выше реципрокной регуляции NKCC1 и KCC2 активность KCC2 возрастает за счет фосфорилирования протеинкиназой C (Bos et al., 2013) и олигомеризации (Hartmann, Nothwang, 2015).

Длительная активация NMDA-рецепторов, сопровождающаяся массивным поступлением Ca^{2+} внутрь клетки, ведет к даун-регуляции KCC2 и сдвигу равновесного потенциала для ионов хлора в сторону более положительных значений, что может быть причиной гипервозбудимости, долговременной потенциации синаптической передачи и эпилептиформных разрядов (Fiumelli et al., 2005; Kitamura et al., 2008). Механизмы, лежащие в основе этого феномена, запускаются при действии повышенной концентрации Ca^{2+} внутри клетки и могут включать в себя активацию протеинфосфатазы-1, дефосфорилирующей серин в позиции 940 в молекуле KCC2, а также опосредованное кальпаином расщепление белков (Lee et al., 2011; Puskarjov et al., 2012; Chamma et al., 2013). Стоит также отметить, что протеинфосфатаза-1 дефосфорилирует и треониновый остаток N-концевого домена NKCC1, ингибируя активность последнего (Darman et al., 2001; Darman, Forbush, 2002; Flemmer et al., 2002; Piechotta et al., 2002; Dowd, Forbush, 2003; Kahle et al., 2005; Gagnon, Delpire, 2010; Filippi et al., 2011; Markadieu, Delpire, 2014).

Немаловажное место в поддержании гомеостаза ионов хлора занимают потенциалзависимые хлорные каналы ClC-2, которые активируются при гиперполяризации мембранны (Staley, 1994; Ben-Ari, 2002). Ряд источников указывает на то, что каналы ClC-2 являются каналами внутреннего выпрямления и работают как клапан, пропуская ионы хлора только изнутри клетки наружу (Staley,

1994; Földy et al., 2010; Rinke et al., 2010; Smart, 2010). Таким образом, каналы ClC-2 поддерживают внутриклеточную концентрацию ионов хлора на низком уровне, что является необходимым условием для развития торможения в ответ на действие ГАМК и глицина (Staley, 1994; Ben-Ari, 2002).

Стоит отметить, что в последнее время появились работы, которые указывают на неоднозначность роли каналов ClC-2. В исследовании на нейронах гиппокампа крысы была показана двойственная роль каналов ClC-2, в одних случаях они обеспечивают выход ионов хлора из нейронов после их массивного поступления в цитоплазму, в других случаях каналы ClC-2 вносят вклад в фоновую проводимость нейронов и тем самым регулируют их возбудимость (Rinke et al., 2010). В исследовании с использованием компьютерного моделирования с последующей экспериментальной проверкой полученных результатов было обнаружено, что каналы ClC-2 при нормальных физиологических условиях способствуют утечке ионов хлора внутрь клетки, тем самым снижая возбудимость нейронов и вероятность возникновения потенциалов действия. Таким образом, функция каналов ClC-2 может заключаться в регулировании только возбудимости нейронов, но не внутриклеточной концентрации ионов хлора (Ratté, Prescott, 2011).

Существует гипотеза, согласно которой в поддержании внутриклеточной концентрации ионов хлора участвуют цитоплазматические анионы, не проникающие через клеточную мембрану ($[\text{A}]_i$), и полианионные внеклеточные гликопротеины ($[\text{A}]_o$). Так, при измерении внутриклеточной концентрации ионов хлора в срезах головного мозга мыши с помощью хлорид-чувствительных флуоресцентных красителей было выявлено, что ингибирование катион-хлоридных котранспортеров оказывало незначительный эффект на величину внутриклеточной концентрации ионов хлора по сравнению с изменением баланса между $[\text{A}]_i$ и $[\text{A}]_o$. Этот феномен объясняется эффектом Гиббса—Доннана, согласно которому концентрация ионов хлора асимметрична за счет неравномерного распределения непроникающих ионов по разные стороны мембранны (Glykys et al., 2014a). В то же время данная гипотеза все еще является предметом дискуссии и существуют некоторые сомнения в ее справедливости (Glykys et al., 2014b; Voipio et al., 2014).

Помимо указанных выше механизмов в регуляции внутриклеточной концентрации ионов хлора в нервной клетке в состоянии покоя могут также участвовать тоническая активация ГАМК_A-рецепторов (Semyanov et al., 2003) и работа некоторых ионных обменников, таких как AE3 и NCBE (Doyon et al., 2011).

Быстрое изменение внутриклеточной концентрации ионов хлора происходит за счет активации ГАМК_A- и глициновых рецепторов, что у зрелых нервных клеток в нормальном физиологическом состоянии приводит либо к шунтированию синаптических токов, либо к синаптическому торможению, сопровождающимся увеличением внутриклеточной концентрации ионов хлора (Staley et al., 1995; Häusser et al., 2001). Ток ионов хлора внутрь клетки через ГАМК_A-рецепторы сопряжен также с выходом ионов гидрокарбоната из клетки, без которого первый быстро стабилизировался бы при достижении мембранным потенциалом уровня реверсии ГАМК-токов ($E_{\text{ГАМК}}$). В этом случае $E_{\text{ГАМК}}$ был бы всегда равен равновесному потенциалу для ионов хлора (E_{Cl}), но из-за выхода ионов гидрокарбоната из клетки $E_{\text{ГАМК}}$ становится более полу-

жительным, чем E_{Cl^-} , благодаря чему внутриклеточная концентрация ионов хлора продолжает увеличиваться, даже когда мембранный потенциал достигает E_{GAMK_A} . В отсутствие других внешних факторов в течение продолжительной активации ГАМК_A-рецепторов внутриклеточное накопление ионов хлора и сдвиг мембранныго потенциала продолжаются до тех пор, пока E_{Cl^-} , E_{GAMK_A} и $E_{HCO_3^-}$ не станут равными друг другу (Doyon et al., 2011).

Интенсивная активация ГАМК_A-рецепторов может перегрузить эндогенную систему, способствующую выходу ионов хлора из клетки, например KCC2, что приводит к быстрому внутриклеточному накоплению ионов хлора (Kaila, Voipio, 1987; Kaila et al., 1989; Thompson, Gahwiler, 1989; Staley et al., 1995; Staley, Proctor, 1999; Ellender et al., 2014). Это в свою очередь является причиной того, что в ряде случаев ГАМК_A-опосредованная синаптическая передача может стать возбуждающей (Raimondo et al., 2015). Было показано, что массивная аккумуляция ионов хлора сопровождает эпилептиiformную активность в большинстве экспериментальных моделей (Lamassa, Kaila, 1997; Isomura et al., 2003; Fujiwara-Tsukamoto et al., 2010; Ilie et al., 2012; Raimondo et al., 2013; Ellender et al., 2014).

Все вышеперечисленные механизмы регуляции внутриклеточной концентрации ионов хлора имеют разную функциональную активность в различных частях нервной клетки, что обуславливает различия в концентрации ионов хлора в разных частях клетки (Cordero-Erausquin et al., 2005; Berglund et al., 2006; Duebel et al., 2006; Khirug et al., 2008).

В зависимости от локализации ГАМК_A- и глициновых рецепторов на поверхности клетки их активация приводит к изменению концентрации ионов хлора как локально, на уровне дендритов, так и на уровне целой клетки. Экспериментальные исследования совместно с компьютерным моделированием продемонстрировали, что активация ГАМК_A-рецепторов и последующий ток ионов хлора внутрь клетки в большей степени изменяют внутриклеточную концентрацию ионов хлора в дендритах, чем в соме (Staley et al., 1995; Staley, Proctor, 1999; Chabwine et al., 2004; Jedlicka et al., 2011; Raimondo et al., 2012). Диффузия ионов хлора внутри клетки в зоны с меньшей концентрацией способствует выведению накопленных ионов хлора из дендритов. Однако в тонких отростках диффузия ионов хлора ограничена малым диаметром компартмента (Doyon et al., 2011), тогда как большой объем сомы удерживает внутриклеточную концентрацию ионов хлора относительно стабильной. Стоит отметить, что скорость диффузии, а следовательно, и степень аккумуляции ионов хлора в дендритах зависит не только от диаметра дендрита, но и от расстояния до сомы (Doyon et al., 2011; Jedlicka et al., 2011; Doyon et al., 2016). Уменьшить концентрацию ионов хлора в дендритах после активации ГАМК_A- или глициновых рецепторов также помогают KCC2, представленные на поверхности дендритов в большом количестве. Скорость экструзии ионов хлора через KCC2 (в дендритах гиппокампальных нервных клеток крысы) составляет порядка 5 mM/c (Staley, Proctor, 1999). Функционирование KCC2 может быть неэффективным при необычно большом поступлении ионов хлора внутрь клетки, что можно наблюдать при патологии или в условиях эксперимента (Doyon et al., 2016). Кроме того, согласно теоретической электродиффузационной модели, после активации ГАМК_A-рецепторов скорость снижения концентрации ионов хлора в дендритах в большей

степени зависит от скорости внутриклеточной диффузии, чем от экструзии ионов хлора через KCC2 (Doyon et al., 2011).

Изменение концентрации ионов хлора в ходе онтогенеза. Согласно классическим представлениям, внутриклеточная концентрация ионов хлора в нервных клетках уменьшается в ходе онтогенеза. В первую очередь это происходит вследствие переключения экспрессии катион-хлоридных котранспортеров с NKCC1 на KCC2 (в результате стимулирования экспрессии KCC2 как совместно с ингибированием экспрессии NKCC1, так и без него) (Delpire, 2000; Vu et al., 2000; Ikeda et al., 2003; Yamada et al., 2004; Dzhala et al., 2005). Кроме того, предполагается, что в ходе онтогенеза устанавливается определенный баланс между $[A]i$ и $[A]o$, который за счет эффекта Гибса—Доннана поддерживает низкую внутриклеточную концентрацию ионов хлора, сформированную посредством KCC2 (Glykys et al., 2014a). В целом, согласно большинству литературных данных, в незрелых нервных клетках внутриклеточная концентрация ионов хлора составляет 25–40 mM (Balakrishnan et al., 2003; Yamada et al., 2004; Sipila et al., 2006; Achilles et al., 2007), а в зрелых — около 5 mM (Khirug et al., 2008; Tuzio et al., 2008). Но при этом недавнее исследование с применением хлорид-чувствительных флуоресцентных красителей позволяет усомниться в справедливости этих представлений. Было показано, что в нейронах срезов гиппокампа и коры как у молодых (P8–P9), так и у взрослых (P32–P44) мышей внутриклеточная концентрация ионов хлора варьирует в очень широком диапазоне. Так, для зоны CA1 гиппокампа значения соматической концентрации ионов хлора для молодых мышей составляют 14.7 ± 6.5 (медиана \pm ст. отклонение, $n = 237$) и 13.7 ± 8.9 ($n = 227$) mM для взрослых животных (Glykys et al., 2014a).

Снижение концентрации ионов хлора в нервных клетках в процессе онтогенеза происходит в разных отделах мозга в разное время. Раньше всего оно наблюдается в наиболее эволюционно древних отделах мозга и происходит в следующей последовательности — спинной мозг, гипоталамус и таламус, лимбическая система, неокорктекс (Watanabe, Fukuda, 2015). Стоит отметить, что не во всех клетках нервной системы происходит снижение внутриклеточной концентрации ионов хлора в ходе онтогенеза. Например, нет существенной разницы в концентрации ионов хлора внутри астроцитов гиппокампа крысы как у новорожденных, так и у зрелых животных (Bekar, Walz, 1999).

Изменения концентрации ионов хлора при патологических состояниях. При различных патологических состояниях мозга, например при эпилепсии (Schwartzkroin, Knowles, 1984), невропатической боли (Coull et al., 2003; Dzhala, Staley, 2003; Payne et al., 2003; Coull et al., 2005; Huberfeld et al., 2007; Kahle et al., 2008), воспалении, ишемии нервной ткани (Galeffi et al., 2004; Papp et al., 2008; Jaenisch et al., 2010), при сотрясении мозга (Bonislawski et al., 2007), хронической боли в спине (Coull et al., 2005; De Konink, 2007; Price et al., 2009), после аксотомии (Nabekura et al., 2002; Toyoda et al., 2003) и при механическом повреждении неокорктекса (Jin et al., 2005), увеличивается внутриклеточная концентрация ионов хлора, что связано с даун-регуляцией KCC2, которая в некоторых случаях сопровождается ап-регуляцией NKCC1 (Palma et al., 2006; Huberfeld et al., 2007; Muñoz et al., 2007; Barmashenko et al., 2011).

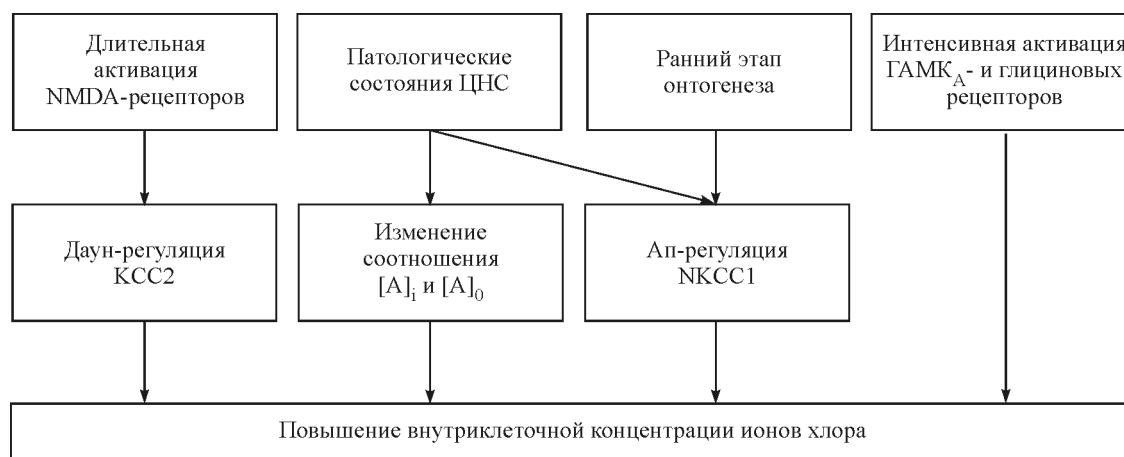


Рис. 3. Состояния, при которых происходит увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора.

Как было указано выше, в зрелых нервных клетках для нормального функционирования нервной системы, в частности для генерации гиперполяризующего постсинаптического тока, внутриклеточная концентрация ионов хлора должна поддерживаться на низком уровне. Это в основном достигается за счет работы KCC2, которая опосредованно сопряжена с работой $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФазы (Kaila et al., 2014). При патологических состояниях нервной ткани может возникнуть энергоеффицит, который приводит к даун-регуляции $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФазы (Pylova et al., 1989; Ross, Soltesz, 2000). Синхронно с этим происходит даун-регуляция KCC2 (Hansen, 1985; Buzsáki et al., 2007; Blaesse et al., 2009; Kaila et al., 2014), что необходимо для поддержания стабильности $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -градиента в отсутствие адекватной работы $\text{Na}^+ \text{-K}^+$ -АТФазы. Более того, так как ГАМКергическое торможение снижает интенсивность нейропластических процессов, увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора за счет даун-регуляции KCC2, приводящее к устранению ГАМКергического торможения, необходимо для функционального восстановления нервной системы (Clarkson et al., 2010; Karrova et al., 2011). Таким образом, даун-регуляция KCC2, сопровождающая нейрональные нарушения, может быть частью общих адаптивных ответов клетки, способствующих ее выживанию за счет сокращения энергетических затрат, необходимых для поддержания низкой внутриклеточной концентрации ионов хлора (Nabekura et al., 2002; Rivera et al., 2002; Coull et al., 2003; Jin et al., 2005; Pathak et al., 2007; Boulenguez et al., 2010; Jaenisch et al., 2010; Zhou et al., 2012).

Даун-регуляция KCC2, происходящая при нарушениях функционирования нервной ткани, реализуется за счет разных механизмов. В нейронах коры головного мозга и нейронах спинного мозга даун-регуляция KCC2 в случае травмы или эпилептического припадка индуцируется как путем активации тирозинкиназного рецептора B и NMDA-рецепторов, так и путем активации определенных ферментов — тропомиозинависимой киназы B, кальпаина и, возможно, протеинфосфатазы-1 (Rivera et al., 2002, 2004; Coull et al., 2005; Lee et al., 2011; Puskarjov et al., 2012; Zhou et al., 2012). Стоит отметить, что при патологических состояниях нервной ткани даун-регуляция KCC2 часто сопровождается ап-регуляцией NKCC1 (Huberfeld et al., 2007; Shulga et al., 2008).

Кроме того, при некоторых патологических состояниях нервной системы возрастает внутриклеточная кон-

центрация Zn^{2+} (Weiss et al., 2000). В свою очередь Zn^{2+} напрямую ингибирует KCC2 (Hershfinkel et al., 2009).

Следует дифференцировать адаптивные и патологические состояния, связанные с изменениями регуляторных систем, поддерживающих внутриклеточную концентрацию ионов хлора (Kaila et al., 2014). Например, при глиоме хлорный гомеостаз нарушается как в клетках глиомы, что является патологическим (онкологическим) процессом, вовлеченный в процессы пролиферации и миграции глиомы (Labrakakis et al., 1998; Young, Bordey, 2009), так и в перитуморальных нейронах, где является адаптивным процессом, развивающимся в ответ на энергетический дефицит (Habela et al., 2008, 2009). Изменение концентрации ионов хлора в нейронах, локализованных около глиомы, объясняет повышенную эпилептогенность глиом (van Breemen et al., 2007; Pallud et al., 2013, 2014). В частности, в исследовании, проведенном на постоперационных перитуморальных срезах коры головного мозга, было продемонстрировано, что в нейронах, окружающих глиому, нарушается экспрессия хлоридных котранспортеров: экспрессия KCC2 снижается на 42 %, а NKCC1, наоборот, увеличивается на 144 %. В результате в перитуморальных нейронах повышается внутриклеточная концентрация ионов хлора, а действие ГАМКергической передачи изменяется с тормозного на возбуждающее, что обуславливает эпилептическую активность этих клеток (Pallud et al., 2014).

Таким образом, изменения гомеостаза ионов хлора, характерные для эпилептической активности, могут быть как следствием первичных нарушений в работе KCC2 и NKCC1 (Alger, Nicoll, 1979; Thompson, Gahwiler, 1989; Staley et al., 1995), так и развиться в ответ на травму или сопровождать другие патологические процессы (Nabekura et al., 2002; Rivera et al., 2002; Coull et al., 2003; Jin et al., 2005; Pathak et al., 2007; Boulenguez et al., 2010; Jaenisch et al., 2010; Zhou et al., 2012; Pallud et al., 2014). Помимо этого, при цитотоксическом отеке в результате травмы мозга и антikonвульсант-резистентных судорогах изменяется соотношение $[A]_i$ и $[A]_o$, что также сопровождается увеличением внутриклеточной концентрации ионов хлора (Glykys et al., 2014a). Наиболее распространенные состояния, при которых происходит увеличение внутриклеточной концентрации ионов хлора, в краткой форме обобщены на рис. 3.

Заключение

Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о том, что внутриклеточная концентрация ионов хлора не только определяет эффективность ГАМК- или глицинопосредованного торможения в ЦНС, но и влияет на разнообразные аспекты жизнедеятельности клетки. Самые разные внутриклеточные белки (от белков ионных каналов до транскрипционных факторов) могут существенно изменять свою работу в условиях с разной концентрацией ионов хлора. Сама же внутриклеточная концентрация ионов хлора находится в динамическом равновесии, механизмы поддержания которого могут регулироваться в ходе жизнедеятельности нейрона. Взаимодействие нейронов друг с другом, влияние внешних факторов среды, а также различные патологические состояния потенциально способны модулировать эти механизмы, участвующие в гомеостазе ионов хлора. Таким образом, можно заключить, что помимо общепринятых функций ионов хлора, например регуляции возбудимости нейронов, контролирования осмотического давления, pH клетки и других функций, реализующихся за счет прямого изменения физико-химических свойств клетки при изменении внутриклеточной концентрации ионов хлора, ионы хлора могут иметь и функцию вторичного мессенджера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 15-04-05782) и проекта «Молекулярные механизмы регуляции синаптической передачи» раздела № 0132-2015-0048 программы I.19П президиума РАН.

Список литературы

- Achilles K., Okabe A., Ikeda M., Shimizu-Okabe C., Yamada J., Fukuda A., Luhmann H. J., Kilb W. 2007. Kinetic properties of Cl⁻ uptake mediated by Na⁺-dependent K⁺-2Cl⁻ cotransport in immature rat neocortical neurons. *J. Neurosci.* 27 : 8616—8627.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2008. Molecular biology of the cell. New York: Garland Science. 1268 p.
- Albuquerque E. X., Pereira E. F. R., Alkondon M., Rogers S. W. 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89 : 73—120.
- Alessi D. R., Zhang J., Khanna A., Hochdörfer T., Shang Y., Kahle K. T. 2014. The WNK-SPAK/OSR1 pathway: master regulator of cation-chloride cotransporters. *Sci. Signal.* 7: re3.
- Alger B. E., Nicoll R. A. 1979. GABA-mediated biphasic inhibitory responses in hippocampus. *Nature*. 281 : 315—317.
- Alvarez-Leefmans F., Delpire E. 2009. Physiology and pathology of chloride transporters and channels in the nervous system. London: Acad. Press. 630 p.
- Andrade R., Malenka R. C., Nicoll R. A. 1986. A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science*. 234 : 1261—1265.
- Balakrishnan V., Becker M., Löhrke S., Nothwang H. G., Güresir E., Friauf E. 2003. Expression and function of chloride transporters during development of inhibitory neurotransmission in the auditory brainstem. *J. Neurosci.* 23 : 4134—4145.
- Barmashenko G., Hefft S., Aertsen A., Kirschstein T., Köhling R. 2011. Positive shifts of the GABA_A receptor reversal potential due to altered chloride homeostasis is widespread after status epilepticus. *Epilepsia*. 52 : 1570—1578.
- Bekar L. K., Walz W. 1999. Evidence for chloride ions as intracellular messenger substances in astrocytes. *J. Neurophysiol.* 82: 248—254.
- Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of gaba during development: the nature of the nurture. *Nat. Rev. Neurosci.* 3 : 728—739.
- Berglund K., Schleich W., Krieger P., Loo L. S., Wang D., Cant N. B., Feng G., Augustine G. J., Kuner T. 2006. Imaging synaptic inhibition in transgenic mice expressing the chloride indicator, clomeleon. *Brain Cell Biol.* 35 : 207—228.
- Biel M., Wahl-Schott C., Michalakis S., Zong X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev.* 89 : 847—885.
- Blaesse P., Airaksinen M.S., Rivera C., Kaila K. 2009. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. *Neuron*. 61 : 820—838.
- Bocquet N., Nury H., Baaden M., Le Poupon C., Changeux J.-P., Delarue M., Corringer P.-J. 2009. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature*. 457 : 111—114.
- Bonislawski D. P., Schwarzbach E. P., Cohen A. S. 2007. Brain injury impairs dentate gyrus inhibitory efficacy. *Neurobiol. Dis.* 25 : 163—169.
- Bos R., Sadlaoud K., Boulenguez P., Buttigieg D., Liabeuf S., Brocard C., Haase G., Bras H., Vinay L. 2013. Activation of 5-HT2A receptors upregulates the function of the neuronal K-Cl cotransporter KCC2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 110 : 348—353.
- Boulenguez P., Liabeuf S., Bos R., Bras H., Jean-Xavier C., Brocard C., Stil A., Darbon P., Cattaert D., Delpire E., Marsala M., Vinay L. 2010. Down-regulation of the potassium-chloride cotransporter KCC2 contributes to spasticity after spinal cord injury. *Nat. Med.* 16 : 302—307.
- Breemen M. S. M., van Wilms E. B., Vecht C. J. 2007. Epilepsy in patients with brain tumours: epidemiology, mechanisms, and management. *Lancet Neurol.* 6 : 421—430.
- Breitwieser G. E., Szabo G. 1985. Uncoupling of cardiac muscarinic and β-adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. *Nature*. 317 : 538—540.
- Brodin L., Löw P., Gad H., Gustafsson J., Pieribone V. A., Shupliakov O. 1997. Sustained neurotransmitter release: new molecular clues. *Eur. J. Neurosci.* 9 : 2503—2511.
- Brumback A. C., Staley K. J. 2008. Thermodynamic regulation of NKCC1-mediated Cl⁻ cotransport underlies plasticity of GABA(A) signaling in neonatal neurons. *J. Neurosci.* 28 : 1301—1312.
- Buzsáki G., Kaila K., Raichle M. 2007. Inhibition and brain work. *Neuron*. 56 : 771—783.
- Caplow M. 1992. Microtubule dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 58—65.
- Chabwine J. N., Van Damme P., Eggermont J., De Smedt H., Missiaen L., Van Den Bosch L., Parys J.B., Robberecht W., Callewaert G. 2004. Long-lasting changes in GABA responsiveness in cultured neurons. *Neurosci. Lett.* 365 : 69—72.
- Chamma I., Heubl M., Chevy Q., Renner M., Moutkine I., Eugene E., Poncer J. C., Levi S. 2013. Activity-dependent regulation of the K/Cl transporter KCC2 membrane diffusion, clustering, and function in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 33: 15 488—15 503.
- Clarkson A. N., Huang B. S., Macisaac S. E., Mody I., Carmichael S. T. 2010. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature*. 468 : 305—309.
- Codina J., Yatani A., Grenet D., Brown A. M., Birnbaumer L. 1987. The alpha subunit of the GTP binding protein G_K opens atrial potassium channels. *Science*. 236 : 442—445.
- Conde C., Cáceres A. 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat. Rev. Neurosci.* 10 : 319—332.
- Cordero-Erausquin M., Coull J. A. M., Boudreau D., Roland M., De Koninck Y. 2005. Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J. Neurosci.* 25 : 9613—9623.
- Coull J. A. M., Beggs S., Boudreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter M. W., De Koninck Y. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*. 438 : 1017—1021.

- Coull J. A. M., Boudreau D., Bachand K., Prescott S. A., Nault F., Sik A., De Koninck P., De Koninck Y. 2003. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature*. 424 : 938—942.
- Craig A. M., Bunker G. 1994. Neuronal polarity. *Annu. Rev. Neurosci.* 17 : 267—310.
- Darman R. B., Flemmer A., Forbush B. 2001. Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. *J. Biol. Chem.* 276 : 34 359—34 362.
- Darman R. B., Forbush B. 2002. A regulatory locus of phosphorylation in the N terminus of the Na-K-Cl cotransporter, NKCC1. *J. Biol. Chem.* 277 : 37 542—37 550.
- DeFazio R. A., Keros S., Quick M. W., Hablitz J. J. 2000. Potassium-coupled chloride cotransport controls intracellular chloride in rat neocortical pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 20 : 8069—8076.
- De Koninck Y. 2007. Altered chloride homeostasis in neurological disorders: a new target. *Curr. Opin. Pharmacol.* 7 : 93—99.
- Delpire E. 2000. Cation-chloride cotransporters in neuronal communication. *News Physiol. Sci. Int. J. Physiol. Prod.* Jointly Int. Union Physiol. Sci. Amer. Physiol. Soc. 15 : 309—312.
- Delpire E., Gagnon K. B. E. 2008. SPAK and OSR1: STE20 kinases involved in the regulation of ion homeostasis and volume control in mammalian cells. *Biochem. J.* 409 : 321—331.
- Dotti C. G., Sullivan C. A., Bunker G. A. 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* 8 : 1454—1468.
- Dowd B. F. X., Forbush B. 2003. PASK (proline-alanine-rich STE20-related kinase), a regulatory kinase of the Na-K-Cl cotransporter (NKCC1). *J. Biol. Chem.* 278 : 27 347—27 353.
- Doyon N., Prescott S. A., Castonguay A., Godin A. G., Kröger H., De Koninck Y. 2011. Efficacy of synaptic inhibition depends on multiple, dynamically interacting mechanisms implicated in chloride homeostasis. *PLoS Comput. Biol.* 7 : e1002149.
- Doyon N., Vinay L., Prescott S. A., De Koninck Y. 2016. Chloride regulation: a dynamic equilibrium crucial for synaptic inhibition. *Neuron*. 89 : 1157—1172.
- Duebel J., Haverkamp S., Schleich W., Feng G., Augustine G. J., Kuner T., Euler T. 2006. Two-photon imaging reveals somatodendritic chloride gradient in retinal ON-type bipolar cells expressing the biosensor Clomeleon. *Neuron*. 49 : 81—94.
- Dzhala V. I., Staley K. J. 2003. Excitatory actions of endogenously released GABA contribute to initiation of ictal epileptiform activity in the developing hippocampus. *J. Neurosci.* 23 : 1840—1846.
- Dzhala V. I., Talos D. M., Sdrulla D. A., Brumback A. C., Matthews G. C., Benke T. A., Delpire E., Jensen F. E., Staley K. J. 2005. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat. Med.* 11 : 1205—1213.
- Ellender T. J., Raimondo J. V., Irkle A., Lamsa K. P., Akerman C. J. 2014. Excitatory effects of parvalbumin-expressing interneurons maintain hippocampal epileptiform activity via synchronous afterdischarges. *J. Neurosci.* 34 : 15 208—15 222.
- Faundez V., Hartzell H. C. 2004. Intracellular chloride channels: determinants of function in the endosomal pathway. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2004 : re8.
- Fernandez-Pol J. A. 2011. Conservation of multifunctional ribosomal protein metallopanstimulin-1 (RPS27) through complex evolution demonstrates its key role in growth regulation in Archaea, eukaryotic cells, DNA repair, translation and viral replication. *Cancer Genomics Proteomics.* 8 : 105—126.
- Fernandez-Pol J. A., Fletcher J. W., Hamilton P. D., Klos D. J. 1997. Expression of metallopanstimulin and oncogenesis in human prostatic carcinoma. *Anticancer Res.* 17 : 1519—1530.
- Fernandez-Pol J. A., Klos D. J., Hamilton P. D. 1994. Metallopanstimulin gene product produced in a baculovirus expression system is a nuclear phosphoprotein that binds to DNA. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Amer. Assoc. Cancer Res.* 5 : 811—825.
- Filippi B. M., de los Heros P., Mehellou Y., Navratilova I., Gourlay R., Deak M., Plater L., Toth R., Zeqiraj E., Alessi D. R. 2011. MO25 is a master regulator of SPAK/OSR1 and MST3/MST4/YSK1 protein kinases. *EMBO J.* 30 : 1730—1741.
- Fiumelli H., Cancedda L., Poo M. 2005. Modulation of GABAergic transmission by activity via postsynaptic Ca^{2+} -dependent regulation of KCC2 function. *Neuron*. 48 : 773—786.
- Flemmer A. W., Gimenez I., Dowd B. F. X., Darman R. B., Forbush B. 2002. Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. *J. Biol. Chem.* 277 : 37 551—37 558.
- Földy C., Lee S.-H., Morgan R. J., Soltesz I. 2010. Regulation of fast-spiking basket cell synapses by the chloride channel CLC-2. *Nat. Neurosci.* 13 : 1047—1049.
- Forges H., de Bouissou A., Perez F. 2012. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int. J. Biomed. Cell Biol.* 44 : 266—274.
- Frace A. M., Maruoka F., Noma A. 1992. Control of the hyperpolarization-activated cation current by external anions in rabbit sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 453 : 307—318.
- Fraser D. D., Duffy S., Angelides K. J., Perez-Velazquez J. L., Kettenmann H., MacVicar B. A. 1995. GABA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 15 : 2720—2732.
- Fujiwara-Tsukamoto Y., Isomura Y., Imanishi M., Ninomiya T., Tsukada M., Yanagawa Y., Fukai T., Takada M. 2010. Prototypic seizure activity driven by mature hippocampal fast-spiking interneurons. *J. Neurosci.* 30 : 13 679—13 689.
- Gagnon K. B., Delpire E. 2010. Multiple pathways for protein phosphatase 1 (PP1) regulation of Na-K-2Cl cotransporter (NKCC1) function. *J. Biol. Chem.* 285 : 14 115—14 121.
- Galeffi F., Sah R., Pond B. B., George A., Schwartz-Bloom R. D. 2004. Changes in intracellular chloride after oxygen-glucose deprivation of the adult hippocampal slice: effect of diazepam. *J. Neurosci.* 24 : 4478—4488.
- Gamba G. 2005. Molecular physiology and pathophysiology of electroneutral cation-chloride cotransporters. *Physiol. Rev.* 85 : 423—493.
- Ganger D. R., Hamilton P. D., Fletcher J. W., Fernandez-Pol J. A. 1997. Metallopanstimulin is overexpressed in a patient with colonic carcinoma. *Anticancer Res.* 17 : 1993—1999.
- Gersdorff H., von Mattheus G. 1994. Dynamics of synaptic vesicle fusion and membrane retrieval in synaptic terminals. *Nature*. 367 : 735—739.
- Glykys J., Dzhala V., Egawa K., Balena T., Saponjian Y., Kuchibhotla K., Bacskai B., Kahle K., Zeuthen T., Staley K. 2014a. Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration. *Science*. 343 : 670—675.
- Glykys J., Dzhala V., Egawa K., Balena T., Saponjian Y., Kuchibhotla K. V., Bacskai B. J., Kahle K. T., Zeuthen T., Staley K. J. 2014b. Response to comments on «Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration». *Science*. 345 : 1130.
- Haas M., McBrayer D., Lytle C. 1995. $[\text{Cl}^-]$ -dependent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 270 : 28 955—28 961.
- Habela C. W., Ernest N. J., Swindall A. F., Sontheimer H. 2009. Chloride accumulation drives volume dynamics underlying cell proliferation and migration. *J. Neurophysiol.* 101 : 750—757.
- Habela C. W., Olsen M. L., Sontheimer H. 2008. CIC3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28 : 9205—9217.
- Halliwell J. V., Adams P. R. 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250 : 71—92.
- Hamm-Alvarez S. F., Sheetz M. P. 1998. Microtubule-dependent vesicle transport: modulation of channel and transporter activity in liver and kidney. *Physiol. Rev.* 78 : 1109—1129.
- Hancock J. 2016. Cell signaling. New York: Oxford Univ. Press. 456 p.
- Hansen A. J. 1985. Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.* 65 : 101—148.
- Hartmann A.-M., Nothwang H. G. 2015. Molecular and evolutionary insights into the structural organization of cation chloride cotransporters. *Front. Cell. Neurosci.* 8.
- Häusser M., Major G., Stuart G. J. 2001. Differential shunting of EPSPs by action potentials. *Science*. 291 : 138—141.

- Heidbüchel H., Callewaert G., Vereecke J., Carmeliet E.* 1990. ATP-dependent activation of atrial muscarinic K⁺ channels in the absence of agonist and G-nucleotides. *Pflugers Arch.* 416 : 213—215.
- Heidbüchel H., Callewaert G., Vereecke J., Carmeliet E.* 1992. Membrane-bound nucleoside diphosphate kinase activity in atrial cells of frog, guinea pig, and human. *Circ. Res.* 71 : 808—820.
- Herós P., delos Alessi D. R., Gourlay R., Campbell D. G., Deak M., Macartney T. J., Kahle K. T., Zhang J.* 2014. The WNK-regulated SPAK/OSR1 kinases directly phosphorylate and inhibit the K⁺-Cl⁻ co-transporters. *Biochem. J.* 458 : 559—573.
- Hershfinkel M., Kandler K., Knoch M. E., Dagan-Rabin M., Aras M. A., Abramovitch-Dahan C., Sekler I., Aizenman E.* 2009. Intracellular zinc inhibits KCC2 transporter activity. *Nat. Neurosci.* 12 : 725—727.
- Hibbs R. E., Gouaux E.* 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature.* 474 : 54—60.
- Higashijima T., Ferguson K. M., Sternweis P. C.* 1987. Regulation of hormone-sensitive GTP-dependent regulatory proteins by chloride. *J. Biol. Chem.* 262 : 3597—3602.
- Hilf R. J. C., Dutzler R.* 2009. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature.* 457 : 115—118.
- Hiraoka K., Miyazaki H., Niisato N., Iwasaki Y., Kawauchi A., Miki T., Marunaka Y.* 2010. Chloride ion modulates cell proliferation of human androgen-independent prostatic cancer cell. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 25 : 379—388.
- Houston C. M., Bright D. P., Sivilotti L. G., Beato M., Smart T. G.* 2009. Intracellular chloride ions regulate the time course of GABA-mediated inhibitory synaptic transmission. *J. Neurosci.* 29 : 10 416—10 423.
- Huberfeld G., Wittner L., Clemenceau S., Baulac M., Kaila K., Miles R., Rivera C.* 2007. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci.* 27 : 9866—9873.
- Hull C., von Gersdorff H.* 2004. Fast endocytosis is inhibited by GABA-mediated chloride influx at a presynaptic terminal. *Neuron.* 44 : 469—482.
- Ikeda M., Toyoda H., Yamada J., Okabe A., Sato K., Hotta Y., Fukuda A.* 2003. Differential development of cation-chloride cotransporters and Cl⁻ homeostasis contributes to differential GABAergic actions between developing rat visual cortex and dorsal lateral geniculate nucleus. *Brain Res.* 984 : 149—159.
- Ilie A., Raimondo J. V., Akerman C. J.* 2012. Adenosine release during seizures attenuates GABA_A receptor-mediated depolarization. *J. Neurosci.* 32 : 5321—5332.
- Inoue K., Furukawa T., Kumada T., Yamada J., Wang T., Inoue R., Fukuda A.* 2012. Taurine inhibits K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 to regulate embryonic Cl⁻ homeostasis via with-no-lysine (WNK) protein kinase signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 287 : 20 839—20 850.
- Isomura Y., Sugimoto M., Fujiwara-Tsukamoto Y., Yamamoto-Muraki S., Yamada J., Fukuda A.* 2003. Synaptically activated Cl⁻ accumulation responsible for depolarizing GABAergic responses in mature hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 90 : 2752—2756.
- Ito H., Sugimoto T., Kobayashi I., Takahashi K., Katada T., Uj M., Kurachi Y.* 1991. On the mechanism of basal and agonist-induced activation of the G protein-gated muscarinic K⁺ channel in atrial myocytes of guinea pig heart. *J. Gen. Physiol.* 98 : 517—533.
- Ivanov I., Cheng X., Sine S. M., McCammon J. A.* 2007. Barriers to ion translocation in cationic and anionic receptors from the Cys-loop family. *J. Amer. Chem. Soc.* 129 : 8217—8224.
- Jaenisch N., Witte O. W., Frahm C.* 2010. Downregulation of potassium chloride cotransporter KCC2 after transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 41 : e151—e159.
- Jedlicka P., Deller T., Gutkin B. S., Backus K. H.* 2011. Activity-dependent intracellular chloride accumulation and diffusion controls GABA(A) receptor-mediated synaptic transmission. *Hippocampus.* 21 : 885—898.
- Jentsch T. J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A. A.* 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82 : 503—568.
- Jin X., Huguenard J. R., Prince D. A.* 2005. Impaired Cl⁻ extrusion in layer V pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex. *J. Neurophysiol.* 93 : 2117—2126.
- Kahle K. T., Rinehart J., de Los Heros P., Louvi A., Meade P., Vazquez N., Hebert S. C., Gamba G., Gimenez I., Lifton R. P.* 2005. WNK3 modulates transport of Cl⁻ in and out of cells: implications for control of cell volume and neuronal excitability. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 16 783—16 788.
- Kahle K. T., Staley K. J., Nahed B. V., Gamba G., Hebert S. C., Lifton R. P., Mount D. B.* 2008. Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 4 : 490—503.
- Kaibara M., Nakajima T., Irisawa H., Giles W.* 1991. Regulation of spontaneous opening of muscarinic K⁺ channels in rabbit atrium. *J. Physiol.* 433 : 589—613.
- Kaila K., Pasternack M., Saarikoski J., Voipio J.* 1989. Influence of GABA-gated bicarbonate conductance on potential, current and intracellular chloride in crayfish muscle fibres. *J. Physiol.* 416 : 161—181.
- Kaila K., Price T. J., Payne J. A., Puskarjov M., Voipio J.* 2014. Cation-chloride cotransporters in neuronal development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 15 : 637—654.
- Kaila K., Voipio J.* 1987. Postsynaptic fall in intracellular pH induced by GABA-activated bicarbonate conductance. *Nature.* 330 : 163—165.
- Karpova N. N., Pickenhagen A., Lindholm J., Tiraboschi E., Kuleskaya N., Ágústsdóttir A., Antila H., Popova D., Akamine Y., Sullivan R., Hen R., Drew L. J., Castrén E.* 2011. Fear erasure in mice requires synergy between antidepressant drugs and extinction training. *Science.* 334 : 1731—1734.
- Keith C. H.* 1990. Neurite elongation is blocked if microtubule polymerization is inhibited in PC12 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 17 : 95—105.
- Khirug S., Yamada J., Afzalov R., Voipio J., Khiroug L., Kaila K.* 2008. GABAergic depolarization of the axon initial segment in cortical principal neurons is caused by the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1. *J. Neurosci.* 28 : 4635—4639.
- Kitamura A., Ishibashi H., Watanabe M., Takatsuru Y., Brodwick M., Nabekura J.* 2008. Sustained depolarizing shift of the GABA reversal potential by glutamate receptor activation in hippocampal neurons. *Neurosci. Res.* 62 : 270—277.
- Kurachi Y., Nakajima T., Sugimoto T.* 1986a. Acetylcholine activation of K⁺ channels in cell-free membrane of atrial cells. *Amer. J. Physiol. — Heart Circ. Physiol.* 251 : H681—H684.
- Kurachi Y., Nakajima T., Sugimoto T.* 1986b. On the mechanism of activation of muscarinic K⁺ channels by adenosine in isolated atrial cells: involvement of GTP-binding proteins. *Pflugers Arch.* 407 : 264—274.
- Kyrozis A., Albuquerque C., Gu J., MacDermott A. B.* 1996. Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptors: fast kinetics and high Ca²⁺ sensitivity in rat dorsal horn neurons. *J. Physiol.* 495 (Pt 2) : 449—463.
- Labarakakis C., Patt S., Hartmann J., Kettenmann H.* 1998. Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur. J. Neurosci.* 10 : 231—238.
- Lamsa K., Kaila K.* 1997. Ionic mechanisms of spontaneous GABAergic events in rat hippocampal slices exposed to 4-amino-pyridine. *J. Neurophysiol.* 78 : 2582—2591.
- Lanius R. A., Pasqualotto B. A., Shaw C. A.* 1993. gamma-Aminobutyric acidA receptor regulation by a chloride-dependent kinase and a sodium-dependent phosphatase. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 20 : 192—198.
- Lee H. H. C., Deeb T. Z., Walker J. A., Davies P. A., Moss S. J.* 2011. NMDA receptor activity downregulates KCC2 resulting in depolarizing GABA_A receptor-mediated currents. *Nat. Neurosci.* 14 : 736—743.
- Legendre P.* 1999. Voltage dependence of the glycine receptor-channel kinetics in the zebrafish hindbrain. *J. Neurophysiol.* 82 : 2120—2129.

- Lenz R. A., Pitler T. A., Alger B. E. 1997. High intracellular Cl⁻ concentrations depress G-protein-modulated ionic conductances. J. Neurosci. 17 : 6133—6141.*
- Lytle C., Forbush B. 1996. Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl. Amer. J. Physiol. 270 : C437—C448.*
- Maccaferri G., Mangoni M., Lazzari A., DiFrancesco D. 1993. Properties of the hyperpolarization-activated current in rat hippocampal CA1 pyramidal cells. J. Neurophysiol. 69 : 2129—2136.*
- Magleby K. L., Stevens C. F. 1972. The effect of voltage on the time course of end-plate currents. J. Physiol. 223 : 151—171.*
- Markadieu N., Delpire E. 2014. Physiology and pathophysiology of SLC12A1/2 transporters. Pflugers Arch. 466 : 91—105.*
- Matthews G., Ayoub G. S., Heidelberger R. 1994. Presynaptic inhibition by GABA is mediated via two distinct GABA receptors with novel pharmacology. J. Neurosci. 14 : 1079—1090.*
- Mistrik P., Pfeifer A., Biel M. 2006. The enhancement of HCN channel instantaneous current facilitated by slow deactivation is regulated by intracellular chloride concentration. Pflugers Arch. 452 : 718—727.*
- Miyazaki H., Shiozaki A., Niisato N., Ohsawa R., Itoi H., Ueda Y., Otsuji E., Yamagishi H., Iwasaki Y., Nakano T., Nakahara T., Marunaka Y. 2008. Chloride ions control the G1/S cell-cycle checkpoint by regulating the expression of p21 through a p53-independent pathway in human gastric cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 366 : 506—512.*
- Moriyama Y., Nelson N. 1987. The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. J. Biol. Chem. 262 : 9175—9180.*
- Moroni M., Biro I., Giugliano M., Vijayan R., Biggin P. C., Beato M., Sivilotti L. G. 2011. Chloride ions in the pore of glycine and GABA channels shape the time course and voltage dependence of agonist currents. J. Neurosci. 31 : 14 095—14 106.*
- Muñoz A., Méndez P., DeFelipe J., Alvarez-Leefmans F. J. 2007. Cation-chloride cotransporters and GABAergic innervation in the human epileptic hippocampus. Epilepsia. 48 : 663—673.*
- Nabekura J., Ueno T., Okabe A., Furuta A., Iwaki T., Shimizu-Okabe C., Fukuda A., Akaike N. 2002. Reduction of KCC2 expression and GABA_A receptor-mediated excitation after *in vivo* axonal injury. J. Neurosci. 22 : 4412—4417.*
- Nakajima K.-I., Marunaka Y. 2016. Intracellular chloride ion concentration in differentiating neuronal cell and its role in growing neurite. Biochem. Biophys. Res. Commun. 479 : 338—342.*
- Nakajima K., Miyazaki H., Niisato N., Marunaka Y. 2007. Essential role of NKCC1 in NGF-induced neurite outgrowth. Biochem. Biophys. Res. Commun. 359 : 604—610.*
- Nakajima K., Niisato N., Marunaka Y. 2011a. Quercetin stimulates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells via activation of Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾/2Cl⁽⁻⁾ cotransporter. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. 28 : 147—156.*
- Nakajima K.-I., Niisato N., Marunaka Y. 2011b. Genistein enhances the NGF-induced neurite outgrowth. Biomed. Res. Tokyo Jpn. 32 : 351—356.*
- Nakajima K., Niisato N., Marunaka Y. 2012. Enhancement of tubulin polymerization by Cl⁽⁻⁾-induced blockade of intrinsic GTPase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 425 : 225—229.*
- Nakajima T., Sugimoto T., Kurachi Y. 1992. Effects of anions on the G protein-mediated activation of the muscarinic K⁺ channel in the cardiac atrial cell membrane. Intracellular chloride inhibition of the GTPase activity of GK. J. Gen. Physiol. 99 : 665—682.*
- Namba T., Funahashi Y., Nakamura S., Xu C., Takano T., Kai-buchi K. 2015. Extracellular and intracellular signaling for neuronal polarity. Physiol. Rev. 95 : 995—1024.*
- Neves G., Gomis A., Lagnado L. 2001. Calcium influx selects the fast mode of endocytosis in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 15 282—15 287.*
- Ohsawa R., Miyazaki H., Niisato N., Shiozaki A., Iwasaki Y., Otsuji E., Marunaka Y. 2010. Intracellular chloride regulates cell proliferation through the activation of stress-activated protein kinases in MKN28 human gastric cancer cells. J. Cell. Physiol. 223 : 764—770.*
- Okabe K., Yatani A., Brown A. M. 1991. The nature and origin of spontaneous noise in G protein-gated ion channels. J. Gen. Physiol. 97 : 1279—1293.*
- O'Mara M., Cromer B., Parker M., Chung S.-H. 2005. Homology model of the GABA_A receptor examined using brownian dynamics. Biophys. J. 88 : 3286—3299.*
- Paas Y., Gibor G., Graile R., Savatier-Duclert N., Dufresne V., Sunesen M., de Carvalho L.P., Changeux J.-P., Attali B. 2005. Pore conformations and gating mechanism of a Cys-loop receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 15 877—15 882.*
- Pallud J., Capelle L., Huberfeld G. 2013. Tumoral epileptogenicity: how does it happen? Epilepsia. 54 (Suppl. 9) : 30—34.*
- Pallud J., Le Van Quyen M., Bielle F., Pellegrino C., Varlet P., Labussiere M., Cresto N., Dieme M.-J., Baulac M., Duyckaerts C., Kourdougli N., Chazal G., Devaux B., Rivera C., Miles R., Capelle L., Huberfeld G. 2014. Cortical GABAergic excitation contributes to epileptic activities around human glioma. Sci. Transl. Med. 6 : 244ra89.*
- Palma E., Amici M., Sobrero F., Spinelli G., Di Angelantonio S., Ragozzino D., Mascia A., Scopetta C., Esposito V., Miledi R., Eusebi F. 2006. Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 8465—8468.*
- Papp E., Rivera C., Kaila K., Freund T. F. 2008. Relationship between neuronal vulnerability and potassium-chloride cotransporter 2 immunoreactivity in hippocampus following transient forebrain ischemia. Neuroscience. 154 : 677—689.*
- Pasqualato S., Renault L., Cherfils J. 2002. Arf, Arl, Arp and Sar proteins: a family of GTP-binding proteins with a structural device for «front—back» communication. EMBO Rep. 3 : 1035—1041.*
- Pathak H. R., Weissinger F., Terunuma M., Carlson G. C., Hsu F.-C., Moss S. J., Coulter D. A. 2007. Disrupted dentate granule cell chloride regulation enhances synaptic excitability during development of temporal lobe epilepsy. J. Neurosci. 27 : 14 012—14 022.*
- Payne J. A. 1997. Functional characterization of the neuronal-specific K-Cl cotransporter: implications for [K⁺]o regulation. Amer. J. Physiol. 273 : C1516—C1525.*
- Payne J. A., Rivera C., Voipio J., Kaila K. 2003. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. Trends Neurosci. 26 : 199—206.*
- Pfaffinger P. J., Martin J. M., Hunter D. D., Nathanson N. M., Hille B. 1985. GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. Nature. 317 : 536—538.*
- Piala A. T., Moon T. M., Akella R., He H., Cobb M. H., Goldsmith E. J. 2014. Chloride sensing by WNK1 involves inhibition of autophosphorylation. Sci. Signal. 7 : ra41.*
- Piechotta K., Lu J., Delpire E. 2002. Cation chloride cotransporters interact with the stress-related kinases Ste20-related proline-alanine-rich kinase (SPAK) and oxidative stress response 1 (OSR1). J. Biol. Chem. 277 : 50 812—50 819.*
- Pitt S. J., Sivilotti L. G., Beato M. 2008. High intracellular chloride slows the decay of glycinergic currents. J. Neurosci. 28 : 11 454—11 467.*
- Pittel I., Witt-Kehati D., Degani-Katzav N., Paas Y. 2010. Probing pore constriction in a ligand-gated ion channel by trapping a metal ion in the pore upon agonist dissociation. J. Biol. Chem. 285 : 26 519—26 531.*
- Price T. J., Cervero F., Gold M. S., Hammond D. L., Prescott S. A. 2009. Chloride regulation in the pain pathway. Brain Res. Rev. 60 : 149—170.*
- Puskarjov M., Ahmad F., Kaila K., Blaesse P. 2012. Activity-dependent cleavage of the K-Cl cotransporter KCC2 mediated by calcium-activated protease calpain. J. Neurosci. 32 : 11 356—11 364.*
- Pyllova S. I., Majkowska J., Hilgier W., Kapuscinski A., Albrecht J. 1989. Rapid decrease of high affinity ouabain binding sites in hippocampal CA1 region following short-term global cerebral ischemia in rat. Brain Res. 490 : 170—173.*
- Raimondo J. V., Burman R. J., Katz A. A., Akerman C. J. 2015. Ion dynamics during seizures. Front. Cell. Neurosci. 9.*

- Raimondo J. V., Joyce B., Kay L., Schlagheck T., Newey S. E., Srinivas S., Akerman C. J. 2013. A genetically-encoded chloride and pH sensor for dissociating ion dynamics in the nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 7 : 202.
- Raimondo J. V., Markram H., Akerman C. J. 2012. Short-term ionic plasticity at GABAergic synapses. *Front. Synaptic Neurosci.* 4 : 5.
- Ratté S., Prescott S. A. 2011. ClC-2 channels regulate neuronal excitability, not intracellular chloride levels. *J. Neurosci.* 31 : 15 838—15 843.
- Rinehart J., Maksimova Y. D., Tanis J. E., Stone K. L., Hodson C. A., Zhang J., Risinger M., Pan W., Wu D., Colangelo C. M., Forbush B., Joiner C. H., Gulcicek E. E., Gallagher P. G., Lifton R. P. 2009. Sites of regulated phosphorylation that control K-Cl cotransporter activity. *Cell.* 138 : 525—536.
- Rinke I., Artmann J., Stein V. 2010. ClC-2 voltage-gated channels constitute part of the background conductance and assist chloride extrusion. *J. Neurosci.* 30 : 4776—4786.
- Rivera C., Li H., Thomas-Crusells J., Lahtinen H., Viitanen T., Nanobashvili A., Kokkaia Z., Airaksinen M. S., Voipio J., Kaila K., Saarma M. 2002. BDNF-induced TrkB activation down-regulates the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and impairs neuronal Cl⁻ extrusion. *J. Cell Biol.* 159 : 747—752.
- Rivera C., Voipio J., Payne J. A., Ruusuvuori E., Lahtinen H., Lamsa K., Pirvola U., Saarma M., Kaila K. 1999. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature.* 397 : 251—255.
- Rivera C., Voipio J., Thomas-Crusells J., Li H., Emri Z., Sipilä S., Payne J. A., Minichiello L., Saarma M., Kaila K. 2004. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J. Neurosci.* 24 : 4683—4691.
- Rodríguez-Manzaneque M. T., Tamarit J., Belli G., Ros J., Herrero E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol. Biol. Cell.* 13 : 1109—1121.
- Ross S. T., Soltesz I. 2000. Selective depolarization of interneurons in the early posttraumatic dentate gyrus: involvement of the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. *J. Neurophysiol.* 83 : 2916—2930.
- Russell J. M. 2000. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol. Rev.* 80 : 211—276.
- Sacchi O., Rossi M. L., Canella R., Fesce R. 2011. Changes in cationic selectivity of the nicotinic channel at the rat ganglionic synapse: a role for chloride ions? *PLoS ONE.* 6.
- Schwartzkroin P. A., Knowles W. D. 1984. Intracellular study of human epileptic cortex: *in vitro* maintenance of epileptiform activity? *Science.* 223 : 709—712.
- Semyanov A., Walker M. C., Kullmann D. M. 2003. GABA uptake regulates cortical excitability via cell type-specific tonic inhibition. *Nat. Neurosci.* 6 : 484—490.
- Sheyevnikov N., Son A., Hong J. H., Yamazaki O., Ohana E., Kurtz I., Shin D. M., Mualem S. 2015. Intracellular Cl⁻ as a signaling ion that potently regulates Na⁺/HCO₃⁻ transporters. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112 : E329—E337.
- Shulga A., Thomas-Crusells J., Sigl T., Blaeser A., Mestres P., Meyer M., Yan Q., Kaila K., Saarma M., Rivera C., Giehl K. M. 2008. Posttraumatic GABA(A)-mediated [Ca²⁺]i increase is essential for the induction of brain-derived neurotrophic factor-dependent survival of mature central neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28 : 6996—7005.
- Simon M. I., Strathmann M. P., Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science.* 252 : 802—808.
- Sipilä S. T., Schuchmann S., Voipio J., Yamada J., Kaila K. 2006. The cation-chloride cotransporter NKCC1 promotes sharp waves in the neonatal rat hippocampus. *J. Physiol.* 573 : 765—773.
- Smart T. G. 2010. Handling accumulated internal Cl⁻ at inhibitory synapses. *Nat. Neurosci.* 13 : 1043—1044.
- Song C., Corry B. 2010. Ion conduction in ligand-gated ion channels: brownian dynamics studies of four recent crystal structures. *Biophys. J.* 98 : 404—411.
- Stack B. C., Hollenbeck C. S., Lee C. M., Dunphy F. R., Lowe V. J., Hamilton P. D. 2004. Metallopanstimulin as a marker for head and neck cancer. *World J. Surg. Oncol.* 2 : 45.
- Staley K. 1994. The role of an inwardly rectifying chloride conductance in postsynaptic inhibition. *J. Neurophysiol.* 72 : 273—284.
- Staley K. J., Proctor W. R. 1999. Modulation of mammalian dendritic GABA_A receptor function by the kinetics of Cl⁻ and HCO₃⁻ transport. *J. Physiol.* 519 : 693—712.
- Staley K. J., Soldo B. L., Proctor W. R. 1995. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. *Science.* 269 : 977—981.
- Stephens R. E., Edds K. T. 1976. Microtubules: structure, chemistry, and function. *Physiol. Rev.* 56 : 709—777.
- Succol F., Fiumelli H., Benfenati F., Cancedda L., Barberis A. 2012. Intracellular chloride concentration influences the GABA_A receptor subunit composition. *Nat. Commun.* 3 : 738.
- Tachibana M., Kaneko A. 1987. gamma-Aminobutyric acid exerts a local inhibitory action on the axon terminal of bipolar cells: evidence for negative feedback from amacrine cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 84 : 3501—3505.
- Thompson S. M., Gähwiler B. H. 1989. Activity-dependent disinhibition. I. Repetitive stimulation reduces IPSP driving force and conductance in the hippocampus *in vitro*. *J. Neurophysiol.* 61 : 501—511.
- Toyoda H., Ohno K., Yamada J., Ikeda M., Okabe A., Sato K., Hashimoto K., Fukuda A. 2003. Induction of NMDA and GABA_A receptor-mediated Ca²⁺ oscillations with KCC2 mRNA downregulation in injured facial motoneurons. *J. Neurophysiol.* 89 : 1353—1362.
- Tsui S. K., Lee S. M., Fung K. P., Waye M. M., Lee C. Y. 1996. Primary structures and sequence analysis of human ribosomal proteins L39 and S27. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 40 : 611—616.
- Tyzio R., Minlebaev M., Rheims S., Ivanov A., Jorquera I., Holmes G. L., Zilberman Y., Ben-Ari Y., Khazipov R. 2008. Postnatal changes in somatic gamma-aminobutyric acid signalling in the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci.* 27 : 2515—2528.
- Unwin N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J. Mol. Biol.* 346 : 967—989.
- Valdivieso A. G., Clauzure M., Massip-Copiz M., Santa-Coloma T. A. 2016. The chloride anion acts as a second messenger in mammalian cells — modifying the expression of specific genes. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 38 : 49—64.
- Voipio J., Boron W. F., Jones S. W., Hopfer U., Payne J. A., Kaila K. 2014. Comment on «Local impermeant anions establish the neuronal chloride concentration.» *Science.* 345 : 1130.
- Vu T. Q., Payne J. A., Copenhagen D. R. 2000. Localization and developmental expression patterns of the neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. *J. Neurosci.* 20 : 1414—1423.
- Wahl-Schott C., Baumann L., Zong X., Biel M. 2005. An arginine residue in the pore region is a key determinant of chloride dependence in cardiac pacemaker channels. *J. Biol. Chem.* 280 : 13 694—13 700.
- Watanabe M., Fukuda A. 2015. Development and regulation of chloride homeostasis in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* 9 : 371.
- Weiss J. H., Sensi S. L., Koh J. Y. 2000. Zn⁽²⁺⁾: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 21 : 395—401.
- Williams J. R., Payne J. A. 2004. Cation transport by the neuronal K⁽⁺⁾-Cl⁽⁻⁾ cotransporter KCC2: thermodynamics and kinetics of alternate transport modes. *Amer. J. Physiol. Cell Physiol.* 287 : C919—C931.
- Wingert R. A., Galloway J. L., Barut B., Foott H., Fraenkel P., Axe J. L., Weber G. J., Dooley K., Davidson A. J., Schmidt B. et al. 2005. Deficiency of glutaredoxin 5 reveals Fe—S clusters are required for vertebrate haem synthesis. *Nature.* 436 : 1035—1039.
- Yamada J., Okabe A., Toyoda H., Kilb W., Luhmann H. J., Fukuda A. 2004. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurones is mediated by NKCC1. *J. Physiol.* 557 : 829—841.
- Young S. Z., Borday A. 2009. GABA's control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches. *Physiol. Bethesda Md.* 24 : 171—185.

Zeuzem S., Feick P., Zimmermann P., Haase W., Kahn R. A., Schulz I. 1992. Intravesicular acidification correlates with binding of ADP-ribosylation factor to microsomal membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89 : 6619—6623.

Zhang B., Ganetzky B., Bellen H. J., Murthy V. N. 1999. Tailoring uniform coats for synaptic vesicles during endocytosis. Neuron. 23 : 419—422.

Zhou H.-Y., Chen S.-R., Byun H.-S., Chen H., Li L., Han H.-D., Lopez-Berestein G., Sood A. K., Pan H.-L. 2012. N-methyl-D-aspartate receptor- and calpain-mediated proteolytic cleavage of K⁺-Cl⁻ cotransporter-2 impairs spinal chloride homeostasis in neuropathic pain. J. Biol. Chem. 287 : 33 853—33 864.

Поступила 5 VI 2017

SIGNALING PROPERTIES OF INTRACELLULAR CHLORIDE IONS

V. A. Semenov,¹ D. V. Amakhin, N. P. Veselkin

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, St. Petersburg, 194223;
¹ e-mail: semenov.vlad.anat@mail.ru

Increasing evidence from basic studies indicates that intracellular chloride ions can affect a lot of aspects of cellular physiology, such as gene expression, regulation of enzyme activity and modulation of ion channels and transporters. The article aims to review the available data on intracellular ions acting as signaling molecules. The first part of the review summarizes the data on different physiological effects of intracellular chloride ions. The second part of the article gives a brief overview of mechanisms of chloride homeostasis and describes changes of intracellular chloride ion concentration in physiological and pathological conditions in nerve cells. We hope that data provided in this article allow considering chloride ions as second messengers with important theoretical and practical implications in further experimental works.

Key words: intracellular chloride-ions, GABAa-receptors, ionic homeostasis, synaptic inhibition, cell signaling.